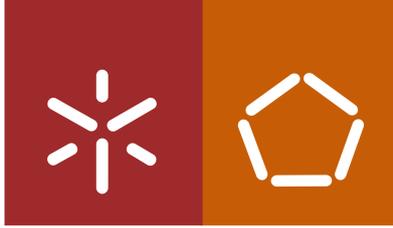


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Margarida Cerqueira Pinto

Modificação *in situ* e *ex situ* da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ana Margarida Cerqueira Pinto

Modificação *in situ* e *ex situ* da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação do
Prof. Doutor Fernando Octávio de Queirós Dourado

outubro de 2013

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Margarida Cerqueira Pinto

Endereço electrónico: margarida.pinto12@gmail.com

Número do Bilhete de Identidade: 13763526

Título dissertação: Modificação *in situ* e *ex situ* da celulose bacteriana: efeito da composição do meio no seu rendimento e propriedades

Orientador(es): Fernando Octávio Queirós Dourado Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

É autorizada a reprodução parcial desta dissertação, apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete,

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Aqui ficam os meus agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram, directa ou indirectamente durante a realização deste trabalho.

Começo por agradecer ao meu orientador, Prof. Fernando Dourado pela oportunidade de desenvolver este tema. Tenho de agradecer a sua orientação, apoio, compreensão, paciência e confiança.

Em segundo, tenho de agradecer ao Jorge por todas as vezes que me ajudou. Obrigada por todos os momentos de trabalho, ajuda, paciência, conversas e diversão que tiveste comigo. Obrigada por me teres aturado durante este tempo, suficiente para ter a certeza que ganhei um amigo para a vida.

Tenho ainda de agradecer a todos do departamento por me ajudarem a não enlouquecer em alguns momentos e por todo o conhecimento laboratorial que foi essencial para que tudo corresse bem. Para o pessoal do LTEB, um agradecimento especial pela boa convivência e companhia, pelas conversas sempre cheias de gargalhadas e por todo o carinho que mostraram. Agradeço também ao professor Miguel Gama por disponibilizar os meios para a realização deste trabalho.

À Ju, por todos os anos de amizade e apoio, por aguentar as minhas conversas chatas, pela diversão e por conseguir mostrar-me que há sempre um lado positivo em qualquer circunstância. Ao Zé Carlos, pelas conversas doidas que me deixam sempre animada e por mostrar o seu apoio, mesmo quando a distância física é imensa. À Lu, por ser capaz de aturar todos os meus dias de mau-humor, mesmo quando a vontade de me “abandonar” era enorme.

À Maria, por todos os ótimos momentos nos últimos 5 anos, por toda a ajuda, risos e loucura e à Diana, por ter ultrapassado comigo alguns dos meses mais complicados do curso, sempre com um conselho sábio e pronta para animar qualquer dia. Agradeço ainda a todos os restantes amigos pelo apoio e ajuda demonstrada.

Por último, mas não menos importantes, à minha família, pela compreensão e apoio durante todo o curso pois sem eles nada disto seria possível.

Não posso deixar de agradecer, especialmente, ao meu afilhado Daniel e à minha priminha Mariana por todas as horas de brincadeira perdidas e por todo o mau feito em algumas alturas.

“The mind that opens to a new idea never returns to its original size.”

Albert Einstein

Sumário

A celulose é o polímero mais abundante e importante existente na Terra, que quando obtido das plantas (Celulose Vegetal – CV) contém impurezas que precisam ser removidas através de processos dispendiosos. No entanto, este polímero também pode ser produzido por algumas bactérias (Celulose Bacteriana – CB), nomeadamente por bactérias do género *Glucanacetobacter xylinus*.

Este biopolímero é considerado um material de excelência devido às propriedades únicas que possui nomeadamente como superfície extremamente hidrofílica, elevada cristalinidade e capacidade de retenção de água, grande resistência mecânica e elevada área superficial, que permitem a sua aplicação em diversos domínios. Além disso, modificações na estrutura da celulose podem permitir alterações nas suas propriedades, obtendo-se um material com maiores aplicabilidades.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações provocadas nas membranas de CB pela adição, *in situ* e *ex situ*, de um derivado da celulose, a carboximetilcelulose (CMC). Além disso, foi produzida celulose num meio tendo como fonte de carbono glucose pura (HS) e noutro melação. A produção foi feita por duas estirpes da bactéria *G. xylinus* ATCC 53582 e ATCC 700178.

O melação foi utilizado sem sofrer qualquer tipo de pré-tratamento mostrando uma produção de celulose bacteriana baixa, para as duas estirpes, quando comparada com o meio HS. No entanto, o rendimento em celulose (expresso em $\text{g}_{\text{CB}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) obtido com este residuo (superior a 200%) foi superior ao obtido para o meio HS (inferior a 50%), mostrando que, industrialmente, a sua utilização pode ser mais favorável. Foi ainda possível concluir que a estirpe ATCC 700178 cresce mais rápido que a outra estirpe em estudo.

Após modificação das membranas, todas elas foram caracterizadas. Neste trabalho verificou-se que a composição do meio de cultura influencia determinadas propriedades da CB: as membranas produzidas em meio de melação mostraram maior hidrofílicidade do que as produzidas no meio HS, de acordo com os resultados dos ensaios das medições dos ângulos de contacto. Na modificação *ex situ*, também as membranas produzidas em meio de melação mostraram maior adsorção de CMC. No entanto, as análises por FTIR indicam que não existe incorporação de CMC nas membranas, nos dois métodos, *in situ* e *ex situ*.

Abstract

Cellulose is the most abundant and important polymer existent on Earth, but when obtained from plants (Vegetable Cellulose-CV) contains impurities that need to be removed through expensive processes. However, this polymer can also be produced by some bacteria (bacterial cellulose-CB), specially by bacteria belonging to the *Glucanocetobacter xylinus* genus.

This biopolymer is considered a biomaterial of excellence due to the unique properties that it has, such as extremely hydrophilic surface, high crystallinity and water-retention capacity, great mechanical strength and high surface area that allow his application in various fields. Furthermore, changing the structure of cellulose may allow changes in its properties, obtaining a material with larger applications.

The purpose of this study was to evaluate the changes caused in the CB membranes by the addition, *in situ* and *ex situ*, of a derivative of cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC). In addition, cellulose was produced on a medium having pure glucose as carbon source (HS) and molasses. The production was done by two strains of the *G. xylinus* bacterium: ATCC 53582 and ATCC 700178.

The molasses was used without suffering any kind of pre-treatment showing a low bacterial cellulose production, for both strains, when compared with the HS medium. However, the yield in cellulose (expressed in $\text{g}_{\text{CB}}/\text{g}_{\text{substrat}}$) obtained with this residue (more than 200%) was higher than that obtained for the HS medium (less than 50%), showing that, industrially, its use can be more favourable. It was also possible to conclude that the strain ATCC 700178 grows faster than the other strain in study.

After membranes modification, all of them were characterized. In this work it has found that the composition of the culture medium influences certain properties of the CB: the membranes produced in the molasses medium showed greater hydrophilicity than those produced in HS medium, according to the results of measurements of contact angles. In *ex situ* modification, also the membranes produced in medium supplemented with molasses showed greater adsorption of CMC. However, the FTIR analyses indicate that there is no addition of CMC membranes, in both methods, *in situ* and *ex situ*.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Sumário	vii
Abstract.....	ix
Índice	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de tabela.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Motivações e objetivos.....	3
1.2. Celulose.....	5
1.3. Produção e morfologia da CB	7
1.4. Propriedades da CB	9
1.5. Aplicações da celulose.....	10
1.6. Carboximetilação.....	11
1.7. Produção de CMC	12
1.8. Características da CMC	13
1.9. Produção de celulose a partir de diferentes substratos	14
1.9.1. Substratos testados	14
1.9.2. Melaço	15
2. Materiais e métodos.....	19
2.1. Produção e limpeza da celulose bacteriana.....	21
2.1.1. Microrganismo usado para produção de celulose	21

2.1.2.	Preparação do inóculo	21
2.1.3.	Meios de cultura	22
2.1.4.	Condições de cultura estática.....	22
2.1.5.	Processo de lavagem da Celulose Bacteriana	23
2.2.	Quantificação de açúcares.....	23
2.3.	Adsorção da CMC à superfície da celulose bacteriana	25
2.4.	Caracterização das membranas de CB	25
2.4.1.	“Swelling” (inchamento)	25
2.4.2.	Medição de ângulos de contacto	26
2.4.3.	Espessura	26
2.4.4.	Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	26
2.5.	Cálculos.....	26
3.	Resultados e discussão	29
3.1.	Modificação <i>in situ</i>	31
3.1.1.	Produção de celulose bacteriana.....	31
3.1.2.	Quantificação de açúcares	35
3.1.3.	Rendimento	37
3.1.4.	Espessura	38
3.1.5.	Grau de <i>swelling</i>	39
3.1.6.	Avaliação da hidrofiliidade	43
3.1.7.	FTIR	46
3.2.	Modificação <i>ex situ</i>	50
3.2.1.	Efeito da temperatura	50
3.2.2.	Efeito da concentração de CMC na solução.....	53
3.2.3.	FTIR.....	54
4.	Conclusões e sugestões para trabalhos futuro.....	59

Lista de abreviaturas

ATCC – American Type Culture Collection

CB – Celulose Bacteriana

CMC - Carboximetilcelulose

CSL – Corn Steep Liquor

CV - Celulose Vegetal

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho

GP – Grau de Polimerização

GS – Grau de substituição

HS – Hestrin-Schram

PBS – Phosphate Buffered Saline

SEM - Microscopia Eletrônica de Varrimento

CRA – Capacidade de retenção de água

Lista de figuras

Figura 1: Posição dos grupos hidroxilo (-OH) no esqueleto de celulose. Retirado de Gardner <i>et al.</i> [17].....	5
Figura 2: Projeção axial ao longo do plano a-b da estrutura da célula unitária da celulose I (a) e II (b). Retirado de Carreira [4]	6
Figura 3: Principais fontes de obtenção de celulose. Retirado de Klemm <i>et al.</i> [26].....	7
Figura 4: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de uma membrana de celulose bacteriana. Adaptado de Andrade <i>et al.</i> [7].....	9
Figura 5: Estrutura de uma molécula de CMC. Retirado de Biswal e Singh [56]	12
Figura 6: Representação estrutural da uma unidade de glucose com a respectiva numeração correspondente aos átomos de carbono. Retirado de Martinez [64]	13
Figura 7: Reação de formação de furfural e hidroximetilfurfural através da desidratação de açúcares simples.....	24
Figura 8: Membranas de celulose bacteriana produzidas: a) estirpe 53582 em meio HS; b) estirpe 53582 em meio de melão; c) estirpe 700178 em meio HS; d) estirpe 700178 em meio de melão	31
Figura 9: Produção de celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melão; d – ATCC 700178 em meio de melão	32
Figura 10: Concentração de açúcares no meio de cultura antes (Dia 0) e no final (Dia 6) da fermentação pela estirpe ATCC 53582.....	35
Figura 11: Concentração de açúcares no meio de cultura antes (Dia 0) e no final (Dia 4) da fermentação pela estirpe ATCC 700178.....	36
Figura 12: Rendimento obtido para a produção de celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melão; d – ATCC 700178 em meio de melão.....	37
Figura 13: Espessura das membranas de celulose bacteriana produzidas: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melão; d – ATCC 700178 em meio de melão.....	39
Figura 14: Grau de <i>swelling</i> ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 53582 em meio HS	40
Figura 15: Grau de <i>swelling</i> ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 700178 em meio HS	41

Figura 16: Grau de <i>swelling</i> ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 53582 em meio de melão	41
Figura 17: Grau de <i>swelling</i> ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 700178 em meio de melão	42
Figura 18: Ângulos de contato das diferentes concentrações de CMC na celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melão; d – ATCC 700178 em meio de melão	44
Figura 19: Gota obtida para medição de ângulo de contacto na membrana de CB no meio HS pela estirpe ATCC 700178 sem adição de CMC	45
Figura 20: Gota obtida para medição de ângulo de contacto na membrana de CB no meio HS pela estirpe ATCC 53582 com 0,75% de CMC no meio	45
Figura 21: Espectro da amostra de CMC obtido por FTIR	47
Figura 22: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 53582 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melão	48
Figura 23: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 700178 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melão	49
Figura 24: Variação do grau de <i>swelling</i> em função do tempo de contato com as soluções de CMC, após 24h em contato com PBS. A) ATCC 53582 em meio HS; B) ATCC 700178 em meio HS; C) ATCC 53582 em meio de melão; D) ATCC 700178 em meio de melão. Temperatura: círculo-20°; quadrado-50°; triângulo-80°	52
Figura 25: Caracterização das membranas de CB modificadas a 80 °C durante 2h em função da concentração das soluções de CMC. A) Variação dos ângulos de contato; B) Variação do grau de <i>swelling</i> . Círculo: ATCC 53582 em meio HS; quadrado: ATCC 700178 em meio HS; triângulo para cima: ATCC 53582 em meio de melão; triângulo para baixo: ATCC 700178 em meio de melão	53
Figura 26: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 53582 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melão	55
Figura 27: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 700178 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melão	56

Lista de tabela

Tabela 1: Exemplos de diferentes espécies produtoras de CB e a sua estrutura. Adaptado de Jonas e Farah [32]	8
Tabela 2: Características da estrutura de celulose das diferentes fontes. Adaptado de Gardner et al. [17]	10
Tabela 3: Consumo e taxa de consumo de açúcares no meio de melaço para as duas estirpes em estudo.	36
Tabela 4: Grau de <i>swelling</i> obtido para as diferentes condições após 24h de imersão em PBS	42
Tabela 5: Ângulo de contato calculados para as diferentes condições de fermentação ao longo do tempo e para as diferentes temperaturas estudadas.....	50

1. Introdução

1.1. Motivações e objetivos

A utilização de recursos fósseis por parte da indústria nos últimos anos tem aumentado a preocupação ambiental devido à poluição provocada pela sua utilização. Além disso, as reservas naturais poderão extinguir-se em poucos anos, pelo que têm de ser encontradas alternativas. Assim, a procura por materiais que provêm de recursos naturais e sejam capazes de substituir os de origem petroquímica tem aumentado. Espera-se que estes materiais sejam capazes de emitir menos poluentes e de economizar energia. Desta forma, os polímeros com origem em materiais renováveis têm sido investigados de forma especial, tendo a celulose ganho grande atenção [1][2].

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra, presente na natureza, como constituinte das paredes celulares de plantas e algas [3]. Normalmente, a celulose utilizada na indústria é a de origem vegetal (CV, celulose vegetal) recorrendo a diferentes processos para a sua obtenção a partir da madeira [4]. No entanto, o uso desta celulose é prejudicial, principalmente a nível ambiental, pois esses processos de obtenção descarregam diferentes poluentes para o meio ambiente [2][4].

Por outro lado, a celulose produzida por algas, fungos e bactérias (CB, celulose bacteriana) apesar de ser morfológicamente diferente da CV, possui a mesma estrutura química e o seu processo de obtenção e purificação é mais simples, sendo uma opção por parte das indústrias.

A *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) é a bactéria mais estudada para a produção de celulose e aquela capaz de obter um maior rendimento em celulose [1][5]. A vantagem da produção de celulose por bactérias do género *Gluconacetobacter* é a variedade de substratos em que esta cresce. A fonte de carbono mais utilizada é a glucose, no entanto, outros estudos mostram a utilização de mono ou dissacarídeos, álcoois ou ácidos dicarboxílicos como substratos capazes de produzir CB [2][4][6].

A celulose produzida pela fermentação da bactéria tem a forma de uma película gelatinosa inerte, insolúvel, mecanicamente resistente e permeável a líquidos. Para além disso, apresenta propriedades físicas e mecânicas únicas como pureza (dado ser unicamente constituída por celulose, ao contrário da de origem vegetal que contém polissacarídeos não-celulósicos e lenhina residual), hidrofiliçidade, biocompatibilidade, alta cristalinidade, grande

1. Introdução

capacidade de retenção de água, elasticidade e durabilidade [7][8]. Além disso, é possível fazer modificações *in situ*, (durante a biossíntese), de forma a alterar as propriedades das fibras da celulose, como incorporação de moléculas bioactivas, modificação da porosidade e da cristalinidade. Estas alterações podem aumentar o potencial uso da CB na indústria e podem ser feitas através da adição de substâncias capazes de incorporar nas fibras da celulose diferentes grupos, como grupos amina, hidroxilos e carboxílicos [9]. Quanto à modificação *ex situ* (após a biossíntese), a maioria dos estudos feitos tem utilizado a incorporação de grupos carboximetil na celulose, tendo este processo diversos métodos, sendo o mais comum a carboximetilação [10]. A aplicação deste método deve-se principalmente ao polímero carboximetilcelulose (CMC), pois são diversas as características que este provoca nas fibras de celulose.

Assim, e devido às propriedades da CB citadas anteriormente, esta tem uma vasta gama de aplicações, nas mais diversas indústrias como a indústria do papel, alimentar, farmacêutica e biomédica, principalmente na área dos tecidos. Aplicações em áreas de cicatrização de feridas, implantes dentários, libertação controlada de fármacos, entre outras têm sido estudadas. Além disso, o primeiro produto comercializado de CB foi na área alimentar, como sobremesa com o nome nata de coco, utilizada principalmente na Ásia.

O facto do interesse da indústria na celulose bacteriana ser elevado e o seu custo de produção, comparativamente com o da CV, ser alto, provoca um aumento na procura de formas de obtenção de altos rendimentos de produção a baixo custo. Uma das soluções, uma vez que a bactéria em estudo utiliza diferentes substratos como fonte de carbono, será a utilização de substratos baratos e disponíveis, como o melão, que é um subproduto resultante da fabricação de açúcar [11].

O objetivo do trabalho aqui apresentado é o estudo da produção de CB usando como fonte de carbono glucose e melão, de forma a avaliar a utilização de este último para a produção industrial, diminuindo assim o custo total final do meio de cultura a utilizar no processo fermentativo. Foi também estudada a adição de diferentes concentrações de carboximetilcelulose ao meio de cultura e analisados o rendimento e as propriedades das membranas produzidas.

1.2. Celulose

A celulose é o biopolímero mais importante e mais abundante na Terra estimando-se uma produção que ronda as 10^{11} toneladas por ano [12–14]. É um polímero de condensação de β -D-gluco-piranoose com ligações 1,4-glicosídicas constituído por uma cadeia longa e linear de apenas um monómero, a glucose ($C_6H_{10}O_5$)_n. A ligação ocorre entre um oxigénio ligado covalentemente ao átomo de carbono 1 de uma molécula de glucose e o átomo de carbono 4 da molécula adjacente, daí a designação (1→4). O número de monómeros de glucose, n, presente na celulose depende da sua fonte. Os grupos hidroxilos presentes nas moléculas formam ligações de hidrogénio entre si tornando a celulose num polímero mais estável e dando origem a estruturas tridimensionais, chamadas de fibrilas (Figura 1) [4][15][16].

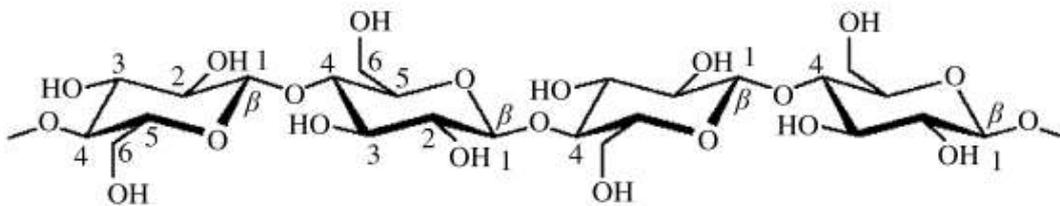


Figura 1: Posição dos grupos hidroxilo (-OH) no esqueleto de celulose. Retirado de Gardner *et al.* [17]

A estrutura macroscópica da celulose é constituída por fibrilas que são originadas por cristais formados por agregados de cadeias de celulose. Estas fibrilas são constituídas por regiões cristalinas (regiões altamente ordenadas) alternadas com regiões amorfas (menos ordenadas), que aparecem devido à má formação dos cristais, a deslocações e/ou às regiões terminais das fibras [18].

Existem duas formas de cristalização nas quais a celulose pode ser encontrada, denominadas celulose I e celulose II. Na celulose I, as cadeias de glucose estão orientadas de forma paralela, não sendo termodinamicamente favoráveis enquanto na celulose II, as cadeias são anti-paralelas, tornando-se mais estável pois possui uma ligação de hidrogénio complementar por cada monómero de glucose (Figura 2) [4][12][15]. A celulose I é mais comum do que a II, e está subdividida em duas estruturas cristalinas diferentes, I_α e I_β (estrutura triclinica e monoclinica, respetivamente), distintas pelo padrão das ligações de hidrogénio intermoleculares. A celulose produzida por bactérias e algas é enriquecida com I_α enquanto a

1. Introdução

celulose das plantas é composta, maioritariamente, por I_{β} . Os dois tipos de celulose são encontrados na natureza. Existem ainda mais 3 tipos de estruturas cristalinas (III, IV e V) mas estes só são produzidos por processos químicos e não são encontrados na natureza [19].

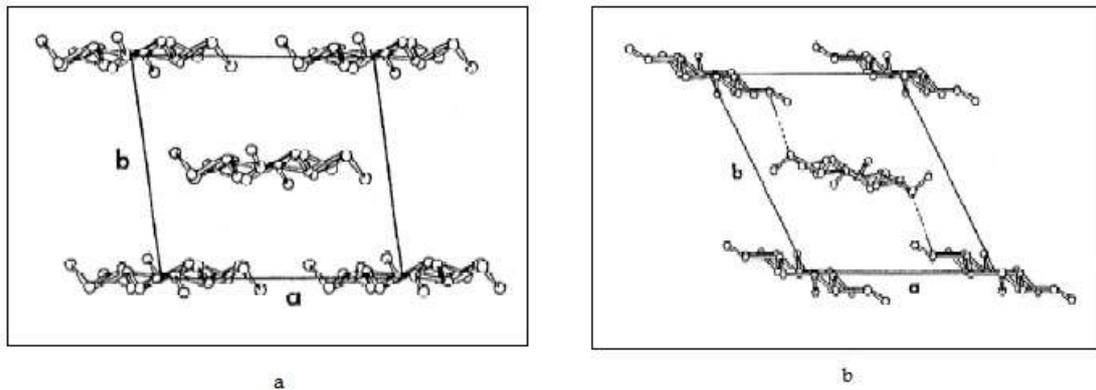


Figura 2: Projeção axial ao longo do plano a-b da estrutura da célula unitária da celulose I (a) e II (b). Retirado de Carreira [4]

Com o aumento da procura das diversas indústrias por produtos à base de celulose, o uso de CV tem trazido problemas a nível ambiental, causando desflorestação e alterando o equilíbrio ecológico. Com isto, e de forma a reduzir o impacto negativo da utilização de CV, tem sido produzida CB para o uso na indústria [20][21].

Existem quatro formas principais de obtenção de celulose, apresentadas na Figura 3. A mais comum é a partir das plantas, estando presente na parede celular destas. A remoção de polissacarídeos não celulósicos e outros, como lignina, pectinas e hemiceluloses, é obtida através de processos químicos. Estes processos dissolvem as impurezas através de transformação química combinada e clivagem, obtendo celulose sólida pouco degradada [22]. Uma fonte alternativa é a biossíntese por diferentes microrganismos, o polissacarídeo recuperado desta forma é denominado de celulose bacteriana, nanocelulose bacteriana ou celulose microbiana [23][24]. As outras duas fontes são menos usuais e baseiam-se em processos de síntese enzimática *in-vitro* e quimiossíntese a partir de derivados de glucose [23][25]. O uso menos frequente destas formas de obtenção de celulose deve-se ao facto da síntese de um polissacarídeo exigir repetições sucessivas de glicosilações, incluindo o controlo da configuração do átomo de carbono anomérico [26]. O primeiro relato de síntese *in-vitro*

refere-se à produção de celulose a partir de fluoreto de celobiose e sobre quimiossíntese refere-se à polimerização de novos derivados de carbonilo [25–27].

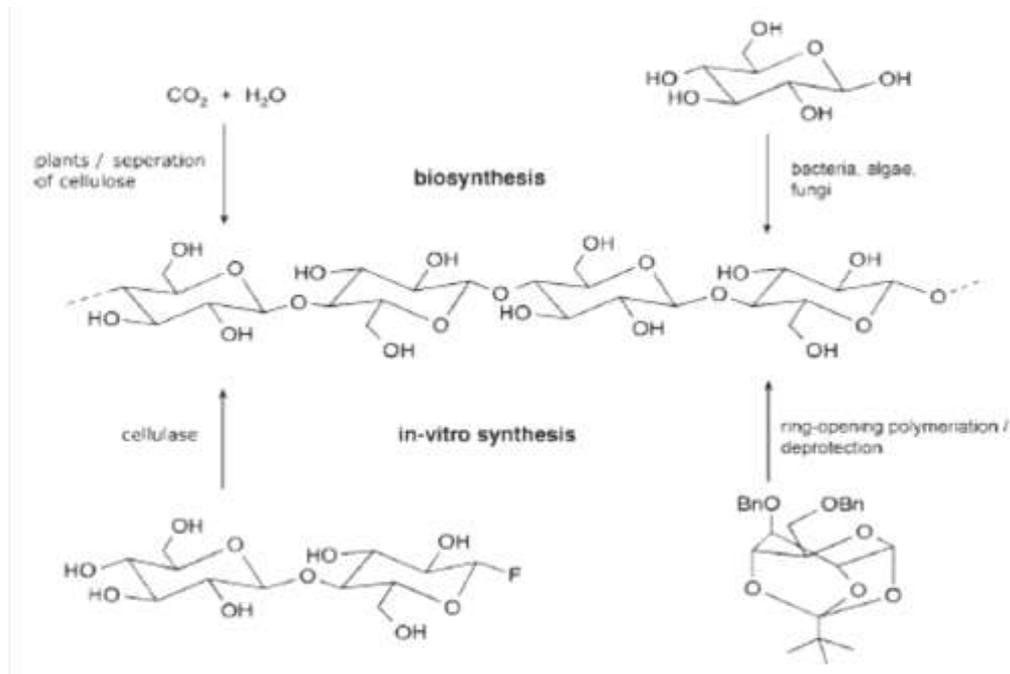


Figura 3: Principais fontes de obtenção de celulose. Retirado de Klemm *et al.* [26]

1.3. Produção e morfologia da CB

Apesar das plantas serem a principal fonte de celulose, a síntese deste polímero também ocorre em vários grupos de algas, fungos e em muitas espécies de bactérias.

A espécie mais estudada para a síntese da celulose tem sido a *Acetobacter xylinum*, reclassificada mais tarde (1997) como *Glucanacetobacter xylinus* [28][29]. No entanto existem outras espécies capazes de produzir celulose, mas nem todas são capazes de a secretar na forma de fibrilas extracelulares e em quantidades significativamente elevadas para garantir o interesse acadêmico e industrial. Espécies dos gêneros como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*, sendo a última a única do tipo gram-positiva, são exemplos de bactérias produtoras de celulose. Na Tabela 1 é apresentada uma visão global sobre estas [12][30–32]. A estrutura da membrana de celulose

1. Introdução

formada depende da bactéria em estudo, embora o processo de biossíntese e o mecanismo que regulam a maioria das bactérias produtoras de celulose sejam certamente comuns [33].

Tabela 1: Exemplos de diferentes espécies produtoras de CB e a sua estrutura. Adaptado de Jonas e Farah [32]

Organismo (espécie)	Celulose produzida	Papel biológico
Acetobacter	Película extracelular Tiras de celulose	Para se manter em ambiente aeróbio
Achromabacter	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Aerobacter	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Agrobacterium	Fibrilas curtas	Ligado aos tecidos vegetais
Alcaligenes	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Pseudomonas	Fibrilas não distinguíveis	Floculação em águas residuais
Rhizobium	Fibrilas curtas	Ligado à maioria das plantas
Sarcina	Celulose amorfa	Desconhecido
Zoogloea	Não está bem definida	Floculação em águas residuais

A primeira descrição feita na literatura sobre a CB foi em 1886, por A. J. Brown quando este constatou que alguns microrganismos utilizados na produção de ácido acético originavam uma membrana na superfície do meio de cultura na presença de glucose e de oxigénio [4][13]. Esta bactéria é gram-negativa, em forma de bastonete e estritamente aeróbia, não fotossintético e com uma temperatura ótima para crescimento entre os 15 e o 34 °C, sendo que entre os 65 e 70 °C ocorre a sua morte térmica. A *G. xylinus* pode ser encontrada em frutas, vegetais e produtos resultantes destes ou em bebidas alcoólicas [3][4]. Tem ainda a vantagem de conseguir converter em celulose diferentes substratos como glucose, frutose, melação, glicerol ou outros substratos orgânicos [6].

A síntese de CB é um processo preciso e específico de várias etapas, no qual estão envolvidos um grande número tanto de enzimas individuais como de complexos de proteínas catalíticas e reguladoras, no qual as estruturas supramoleculares não são ainda precisas [33].

Apesar de ser possível produzir celulose por dois processos distintos, cultura em agitação ou produção em condições estáticas, este último é o mais tradicional. Quando a produção é feita em meio de cultura arejado e agitado, são formados pequenos *pellets* de CB,

irregulares e dispersos no meio. Neste processo, a bactéria tem um crescimento mais rápido mas produz menos celulose.

Na cultura estática ocorre a formação da película de celulose na interface ar-líquido, sendo que as bactérias devem estar perto desta [1][31][33–35]. A película cresce no sentido do meio, existindo duas texturas distintas entre a parte que se encontra em contato com o ar (textura lisa e homogênea) e a que não entra em contato com este (textura rugosa e gelatinosa) [25]. Neste processo, o crescimento da membrana de celulose é maior e fica com a forma do recipiente onde está a crescer [3][36]. A membrana obtida no final da fermentação é constituída por cerca de 99% de água e tem um aspeto gelatinoso, sendo que na sua forma seca, tem aparência de uma folha de papel.

Pela Figura 4, observa-se a estrutura da celulose bacteriana, caracterizada por ser uma rede fibrosa ultrafina com a existência de micro-poros de tamanhos variáveis.

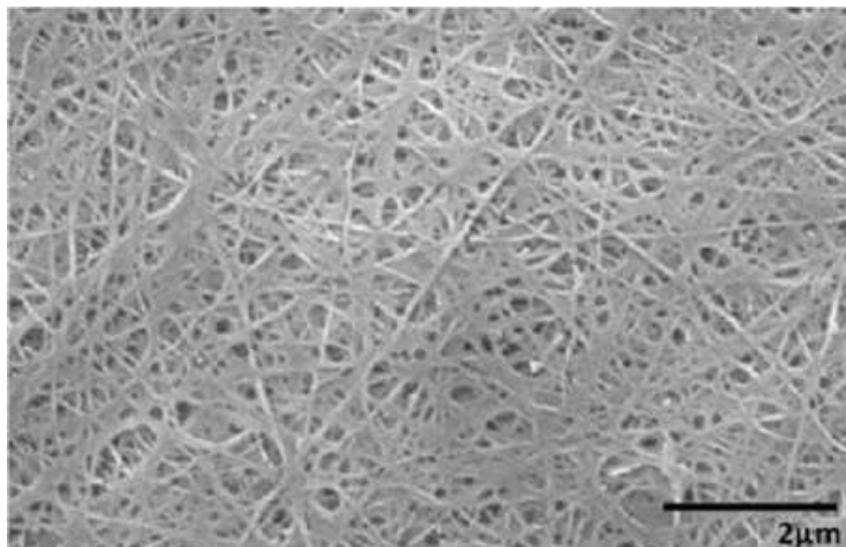


Figura 4: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de uma membrana de celulose bacteriana. Adaptado de Andrade *et al.* [7]

1.4. Propriedades da CB

As propriedades da CB que a tornam única e promissora tem sido as responsáveis por toda a procura da mesma em diversas áreas, como alimentar, papel, têxtil e principalmente, biomédica e medicina moderna. Essas características que tornam a celulose bacteriana um biomaterial de excelência, estão descritas de seguida [7][25][31][33]:

1. Introdução

- Capacidade de retenção de água (CRA) - a CB é altamente hidrofílica, sendo capaz de reter até cerca de 200X o seu peso em água; o volume do meio de cultura é um fator importante no que respeita a estes valores [7];
- Permeabilidade - pode ser alterada com tratamentos após a sua produção;
- Ótimas propriedades mecânicas - estas propriedades resultam devido à estrutura e à alta cristalinidade da celulose; este material possui alta força e estabilidade mecânica e baixa densidade; estas propriedades podem ser alteradas devido a diferentes tratamentos aplicados à celulose depois de produzida [37];
- Cristalinidade - a CB possui um grau de cristalinidade entre 60 e 90% [7];
- Estrutura - a celulose bacteriana é caracterizada por uma estrutura ultrafina, entrelaçada de forma a formar uma rede tridimensional; na Tabela 2 estão as dimensões das nanofibrilas de celulose de diferentes fontes.

Tabela 2: Características da estrutura de celulose das diferentes fontes. Adaptado de Gardner et al. [17]

Fonte de celulose	Tamanho (nm)	Secção transversal (nm)
Algas (Valonia)	>1000	20
Bactérias	100-diversos micrómetros	5-10 até 30-50

1.5. Aplicações da celulose

A celulose bacteriana tem sido utilizada em diversos produtos nas mais variadas áreas, incluindo a indústria têxtil, do papel, da bioengenharia, alimentar, cosmética, entre outras. Alta pureza, boa retenção de água, maior área de superfície e elevada resistência mecânica são algumas das propriedades que tornam o uso de CB tão intensivo [4][38–41].

É na indústria biomédica onde têm sido desenvolvidas mais pesquisas e se tem encontrado mais usos, principalmente no que diz respeito à engenharia de tecidos, para este biopolímero [24]. Nesta área, diferentes estudos já foram realizados sobre a utilização de CB como pele artificial para curar feridas e queimaduras [32], implantes dentários [42], libertação controlada de fármacos [38], próteses vasculares [4][42][43].

Em relação à indústria alimentar, a celulose bacteriana tem sido utilizada na produção de alimentos saudáveis, tendo sido a nata de coco o primeiro alimento de CB comercializado. A

nata de coco é produzida principalmente na Ásia, mas é bastante apreciada no Japão e nos Estados Unidos, a partir de água ou leite de coco,. Após a produção da celulose, esta é cortada em cubos e imersa em xarope de açúcar [44]. Em 1992, a CB foi também introduzida em bebidas dietéticas no Japão. A bactéria *Glucanacetobacter* cresce, juntamente com a levedura, em extrato de chá e açúcar, sendo o meio nutritivo acidificado consumido como Kobumcha (ou chá de kombucha) para melhorar a saúde. A celulose pode também ser utilizada como agente espessante e gelificante em alimentos processados [38][45].

Para além destas aplicações, também tem sido referida a utilização de CB na indústria do papel de forma a aumentar a resistência mecânica e proteger a superfície do papel [46][47] e no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis para alimentos devido às suas características de permeabilidade seletiva [43][48]. Na área da eletrónica a celulose tem sido testada para o uso na formação de altifalantes e auscultadores de alta-fidelidade [32].

1.6. Carboximetilação

Os grupos carboximetil apresentam um papel importante para as fibras devido à sua facilidade de ionização. Tal permite que as fibras tenham algumas propriedades importantes para a indústria, como maior capacidade de retenção de água, força mecânica, hidrofiliidade, entre outras propriedades [10].

Os métodos para introdução destes grupos nas fibras de celulose são diversos, sendo alguns deles os seguintes: oxidação da celulose com dióxido de azoto, ozono, peróxido de hidrogénio ou oxigénio; carboximetilação; uso de corantes substantivos; entre outros [49]. No entanto, o método mais utilizado é a carboximetilação devido, principalmente, às utilizações que o polímero carboximetilcelulose tem demonstrado e às características que provoca nas fibras. Este método tem sido mais utilizado para melhorar as características do papel, pelo que os estudos feitos nos últimos anos tentam estudar as propriedades obtidas pela adição de CMC nas fibras [50–53].

O polímero carboximetilcelulose é derivado da celulose. A estrutura deste é mostrada na Figura 5. Sendo um derivado, as suas moléculas são formadas por unidades repetitivas de glucose carboximetilada, sendo as cadeias poliméricas mais curtas que as originais [54][55].

1. Introdução

Este polímero foi sintetizado pela primeira vez por Jensen (1918), e a sua produção comercial iniciou-se na Alemanha em 1929 [56][57].

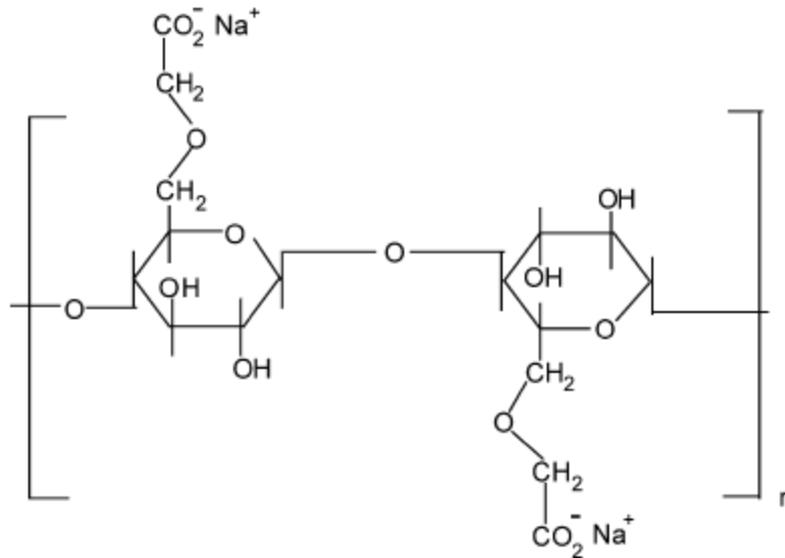


Figura 5: Estrutura de uma molécula de CMC. Retirado de Biswal e Singh [56]

1.7. Produção de CMC

Este polímero, solúvel em água, é obtido por modificação química, via reação de Williamson. Como tal, ocorrem duas reações consecutivas, designadas de alcalinização e esterificação, respetivamente. Inicialmente (Equação 1), a celulose é colocada em contacto com solução de hidróxido de sódio (NaOH) permitindo a quebra das cadeias de celulose e a entrada de água, sendo a concentração desta solução um parâmetro importante nesta fase. Almlöf [58] mostrou que a solução de NaOH deve ter concentração entre 18,25 e 27,5% assim como Hong [59] que relata que concentrações superiores a 25% diminuem o grau de substituição.

Posteriormente, o produto formado, designado de celulose alcalina (Na-celulose), é tratado com monocloroacetato de sódio (ClCH₂COONa), formando a carboximetilcelulose (Equação 2). Simultaneamente, o NaOH reage com o ClCH₂COONa, formando subprodutos como glicolato de sódio e cloreto de sódio [54][55][60][61].



As propriedades físicas e químicas da CMC dependem de fatores como o grau de substituição (GS), o grau de polimerização (GP), a uniformidade da substituição e a pureza final do produto [54].

O grau de substituição representa o número médio de grupos hidroximetil (-CH₂OH) substituídos pelo grupo carboximetil. Os grupos hidroximetil substituídos na celulose são geralmente os do carbono C2, C3 e C6 sendo a sua ordem C2 > C6 > C3 (Figura 6) [57][62]. Assim, o grau de substituição máximo que se pode obter é teoricamente de 3, no entanto, para a CMC disponível para comercialização tem uma gama de GS entre 0,4 – 1,5 [58][63]. Este parâmetro tem grande influência na solubilidade em água, sendo diretamente proporcionais. Quando o grau de CMC é baixo (inferior a 0,2), este retém o carácter fibroso do material original e não é solúvel em água [54][58][60].

O grau de polimerização refere-se ao número de vezes que a estrutura é repetida e está relacionada com o peso molecular e a viscosidade. Ou seja, quanto maior for o GP, maior será o peso molecular e a viscosidade [54].

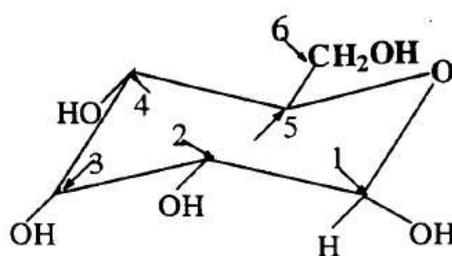


Figura 6: Representação estrutural da uma unidade de glicose com a respetiva numeração correspondente aos átomos de carbono. Retirado de Martinez [64]

1.8. Características da CMC

A CMC, na sua forma purificada, é um pó de cor branca a creme, inodoro, insípido, não é tóxico nem alérgico e apresenta ótima solubilidade à água, tanto fria como quente, e alta viscosidade [62][65]. Para além disso, o facto da CMC ser biodegradável, biocompatível e ter a

1. Introdução

capacidade de fornecer atividade antimicrobiana às fibras tornam a utilização de CMC na indústria alimentar tão procurada [10]. O facto de a CMC ter a um baixo custo de produção também influencia a sua utilização por parte das empresas [50][66].

Segundo Ghannan et Esmail [67] as soluções de CMC são estáveis quando o pH varia entre 2 e 10. Quando este está abaixo de 2, ocorre a precipitação de sólidos e quando se encontra acima de 10 a viscosidade decresce rapidamente.

1.9. Produção de celulose a partir de diferentes substratos

Nas fermentações microbianas, o meio de cultura pode representar cerca de 30% do custo total do processo [68]. Como tal, o desenvolvimento de um meio de cultura de baixo custo capaz de ser utilizado à escala industrial pode ser um dos fatores mais importantes para a diminuição do custo final do produto [69]. Grande parte dos estudos feitos sobre a produção de CB utilizou meios de cultura com açúcares puros como fonte de carbono como glucose, sacarose, frutose e manitol. Para além disto, os meios utilizados nestes estudos são reforçados com fontes complexas de azoto e vitaminas como extrato de levedura e peptona [70–73]. No entanto estes nutrientes são caros e o rendimento é relativamente baixo, tornando a sua utilização economicamente prejudicial [71]. Uma forma de diminuir estes custos seria a utilização de resíduos ou subprodutos industriais de baixo custo, capazes de serem utilizados como fontes de carbono da fermentação de CB [74]. Estes resíduos e subprodutos são, na sua maioria, constituídos por fontes ricas de nutrientes, como carbono, sais, vitaminas, que podem ser utilizados como matéria-prima pelos microrganismos. Entre estes subprodutos temos produtos da beterraba, como melão, xarope de açúcar ou sacarose; produtos de milho, como amido ou glucose; e ainda produtos da batata, amido e hidrolisados de amido [75].

1.9.1. Substratos testados

As fontes de carbono mais utilizadas na bibliografia têm sido a glucose e a sacarose. Em 2003, um estudo feito por Sone *et al.* [73], mostrou que uma estirpe de *Glucanocetobacter sp.*

V6, isolada do vinagre tradicional, produziu 4,16 g/L de CB num meio complexo com glucose como fonte de carbono. Outro estudo, por Mikkelsen *et al.* [76], mostra o efeito de diferentes fontes de carbono (manitol, glucose, glicerol, frutose, sacarose e galactose) na produção de CB pela estirpe *G. xylinus* ATCC 53524 e propriedades obtidas pelas diferentes membranas. Este mostrou que os melhores resultados de produção, após 4 dias, foram obtidos quando se utilizou sacarose e glicerol como fonte de carbono (3,83 e 3,75 g/L, respetivamente). De referir que as restantes fontes de carbono testadas obtiveram valores de produção superiores a 2,5 g/L. Verificou-se ainda que, apesar de a produção ser diferente para os diferentes substratos, as características moleculares do produto final não se modificaram [76].

Para além dos trabalhos de produção de CB a partir de diferentes fontes de carbono, também tem sido bastante estudada a sua produção a partir de substratos de baixo valor como sumos de fruta e subprodutos industriais. Kurosumi *et al.* [77] estudaram o uso de diferentes sumos de fruta para a produção de celulose bacteriana. Ao final de 14 dias de cultivo, foram obtidas, para os sumos de maçã, ananás, pêra japonesa e uva, produções de aproximadamente 0,5 g/L de CB e para o sumo de laranja de 2 g/L. O estudo revela também que a adição de azoto ao meio aumenta a produção de CB em todos os sumos, sendo mais elevadas para o sumo de laranja e pera japonesa (6,9 e 4,8 g/L, respetivamente) [77]. Também já foi testado um efluente do processamento da batata com baixo conteúdo de sólido num estudo feito por Thompson e Hamilton [78]. Este estudo concluiu que este resíduo pode ser utilizado como substrato, obtendo-se uma produção de 5,8 g no final de 14 dias de cultivo.

1.9.2. Melaço

Além destes subprodutos já estudados, são vários os autores que estudaram o uso de melaço, tanto de beterraba como de cana-de-açúcar, como substratos para a produção de CB, sendo vários os artigos que descrevem a sua utilização.

O melaço é um subproduto da produção de açúcar, tanto da beterraba de açúcar como da cana-de-açúcar, obtido da etapa de cristalização. Este é constituído por cerca de 50% de açúcar (sacarose, frutose, glucose, rafinose) sendo grande parte sacarose e não precisa de tratamentos para ser convertido em açúcares fermentáveis, sendo um produto de baixo custo

1. Introdução

[2][79][80]. Apesar de os dois melaços referidos serem semelhantes, existem diferenças em relação aos compostos nitrogenados, açúcares e teor em vitaminas e cinzas [81].

Estudos feitos mostram que o melaço já tem sido utilizado para a produção industrial de produtos químicos importantes, como ácido láctico [79][80], etanol [82][83], ácido cítrico [84], goma xantana [81] e soforolipídeos [85].

De entre os estudos feitos sobre a produção de celulose bacteriana a partir de melaço, Keshk *et al.* [2], estudaram a substituição de glucose por melaço de beterraba, sendo este a única fonte de carbono. O estudo mostrou que o aumento da quantidade de melaço e consequente diminuição de glucose, provocou um aumento na produção de CB pela bactéria *G. xylinus* ATCC 10245. O valor máximo obtido foi de 1,75 g para 100%¹ de melaço como fonte de carbono [2]. Premjet *et al.* [86], no entanto, testaram o melaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de CB. O melaço foi tratado por permuta iónica de forma a obter uma fração rica em açúcar, melaços clarificados e um resíduo negro. Também foi testada a adição de aminoácidos, vitaminas, outros hidratos de carbono e minerais ao melaço, mostrando que todos contribuíram para o aumento do rendimento em 193%, 201%, 186% e 160%, respetivamente [86].

Como se verifica pelos estudos aqui citados, a maioria dos resíduos foram suplementados com outras fontes de nutrientes que, apesar de contribuírem para o aumento da produção de CB, aumentam o custo de produção. Assim, é sempre necessário fazer uma análise à relação custo/produção.

Neste trabalho, além de se estudar o uso de melaço como fonte de carbono para a produção de celulose bacteriana, foi também utilizado licor de milho (Corn steep liquor - CSL) como fonte de azoto. Este é um subproduto do milho de moagem húmida, de baixo custo, rico em diversos nutrientes, contendo vitaminas, minerais, proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono, capaz de suportar um robusto crescimento microbiano durante a fermentação [74][87][88]. A adição do volume apropriado de CSL ao meio de cultura pode ser favorável para a produção de CB.

Os estudos feitos sobre a produção de CB com o uso de CSL são raros, no entanto Santos *et al.* [89] estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono e azoto, mostrando que a combinação de extrato de levedura com CSL ou com peptona produz o maior rendimento de CB. Para além disso, a combinação de peptona e CSL produz uma baixa quantidade de celulose, pelo que o uso de extrato de levedura é necessário [89]. Junge *et al.* [74], estudaram o uso de um meio com melaço e CSL como fonte de carbono e azoto, respetivamente, para a produção de CB pela

¹ Este 100% significa que o meio estudado tem apenas melaço como fonte de carbono, sem adição de glucose.

bactéria *Acetobacter sp. V6*. A maior produção de CB foi obtida quando o melaço sofreu um tratamento com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ obtendo-se 2,09 g/L, sendo 32% superior ao valor obtido para o melaço não tratado, sugerindo que este contém composto que afetam a produção de CB. No meio contendo melaço e CSL, a produção de CB foi máxima depois de 8 dias de incubação (3,12 g/L) [74].

2. Materiais e métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos usados durante a realização do trabalho experimental. Pode ser encontrada a constituição dos meios utilizados para crescimento da celulose bacteriana e a descrição das metodologias utilizadas para a caracterização das membranas.

2.1. Produção e limpeza da celulose bacteriana

2.1.1. Microrganismo usado para produção de celulose

No trabalho experimental em estudo foram usadas duas estirpes da bactéria *Glucanacetobacter xylinus*: ATCC 53582 e a ATCC 700178, que foram mantidas em meio HS sólido a 4°C, sendo que, as placas com meio de cultura eram refrescadas mensalmente. O meio HS é constituído por: glucose (2% p/v), peptona (0,5% p/v), extrato de levedura (0,5% p/v), fosfato de sódio dibásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (0,338% p/v), ácido cítrico (0,15% p/v) e CSL (20% v/v) [90]. No meio sólido, foi adicionado agar (2% p/v). O melaço utilizado para a realização deste trabalho foi gentilmente cedido pela empresa Acembex - Comércio e Serviços, Lda. Já o licor de milho, CSL, pela empresa COPAM - Companhia Portuguesa de Amidos, S.A.

2.1.2. Preparação do inóculo

Para cada estirpe usada, foi preparado um inóculo. Este foi feito transferindo-se, em condições de assepsia, uma colónia crescida em HS sólido para 50 ml de meio HS líquido num Erlenmayer de 250 ml e incubado durante 48h a 30°C, sem agitação.

2. Materiais e métodos

2.1.3. Meios de cultura

Para a produção de CB foram usados dois meios de cultivo diferentes: um meio clássico, HS, e um meio de melaço, ambos preparados em água destilada. O meio HS tinha a composição descrita em 2.1.1 e o meio de melaço (designado agora genericamente por “melaço”) era composto por: ácido cítrico (0,15% p/v), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,34% p/v), sulfato de amónia (1% p/v), CSL (4,27% e 0,73%, v/v) e melaço (7,7% e 2,20%, v/v), sendo que os dois últimos constituintes variam para as duas estirpes, ATCC 700178 e ATCC 53582, respetivamente. Estas concentrações de CSL e melaço foram as escolhidas pois um estudo feito anteriormente, mostrou que estas concentrações obtinham maior produção de celulose bacteriana. O melaço utilizado é constituído por cerca de 9% de açúcares redutores, 37% sacarose e 48% de açúcares totais.² Nos dois meios foi adicionado um aditivo, a CMC, em diferentes concentrações que variam entre 0 e 1% (p/v). O pH do meio de melaço foi ajustado para 5.5 com HCl ou NaOH.

2.1.4. Condições de cultura estática

Foram realizadas 6 séries de ensaios, em triplicado, onde as séries representam as diferentes concentrações de CMC utilizadas: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% (p/v) [12]. Assim, foram preparados 18 Erlenmeyers de 100 ml para cada meio de cultura e para cada uma das estirpes. A cada balão foram adicionados 20 ml do meio (20%, v/v), posteriormente esterilizados a 121 °C, 1 bar durante 20 minutos e inoculados com 150 µl do pré-inóculo preparado. Os balões foram colocados na incubadora a 30 °C, sem agitação, durante 7 dias.

Na produção de CB em melaço, foi retirada uma amostra (100 µl), diariamente, do meio de cultivo para quantificação de açúcares consumidos.

² A composição do melaço está presente na ficha técnica do melaço, fornecida pela Acembex - Comércio e Serviços, Lda

2.1.5. Processo de lavagem da Celulose Bacteriana

Após os 6 dias de fermentação, as membranas de CB produzidas foram retiradas dos balões. No final de cada fermentação, foi realizado um tratamento alcalino para a purificação das membranas de CB: o tratamento iniciou-se com uma lavagem das membranas com água destilada e esterilização durante 20 minutos a 121 °C, 1 bar, num gobelé com cerca de 900 ml de água destilada. Após isto, foram submersas numa solução de hidróxido de sódio (NaOH) (1 M) a 4 °C até que a cor amarela destas (característica da cor do meio de cultura) saísse, resultando em membranas de cor branca. Em seguida as membranas foram lavadas com água da torneira, com várias mudas de água, até atingir pH neutro. Quando este foi atingido, as membranas foram novamente esterilizadas a 121 °C, 1 bar, durante 20 minutos [91–93].

No final do processo, as membranas foram secas numa estufa a cerca de 30 °C até perda total da água, tendo sido quantificadas por massa seca.

2.2. Quantificação de açúcares

Existem diversos métodos desenvolvidos para determinação de hidratos de carbono, como o método fenol-sulfúrico, complexométrico de EDTA, cromatografia em camada delgada e o método de antrona, sendo este último o escolhido neste trabalho [94][95].

Este método consiste na hidrólise das ligações glicosídicas dos hidratos de carbono, desidratando os açúcares simples para furfural (no caso das pentoses) ou hidroximetilfurfural (no caso das hexoses) (Figura 7) [96]. A condensação da antrona com estes dá origem a um produto de cor azul petróleo [95].

2. Materiais e métodos

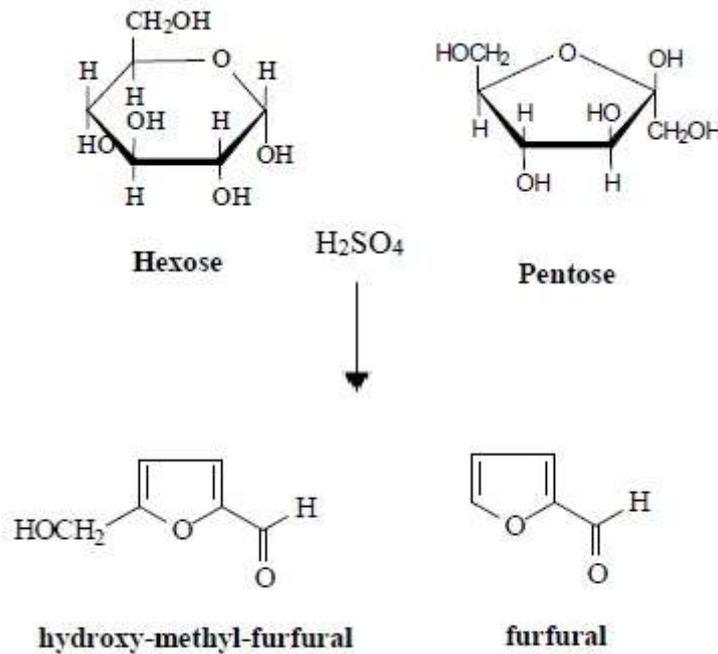


Figura 7: Reação de formação de furfural e hidroximetilfurfural através da desidratação de açúcares simples

Diferentes métodos foram aplicados anteriormente para diferentes gamas de detecção e diferentes períodos de reação. Um dos estudos [97] testou o método em microplacas de 96 poços abrangendo uma gama de detecção de 50 – 400 µg/ml enquanto a gama de detecção testada por Leyva *et al.* [94] é de 10- 120 µg/ml de glucose. O método utilizado neste trabalho é o método proposto por Leyva *et al.* [94], preparado em placas de 96 poços. Resumidamente, a solução de antrona (0,1%, p/v) foi preparada imediatamente antes de ser utilizada, colocando-se 150 µl em cada poço que já continha 50 µl das soluções a analisar (branco, soluções de glucose para a curva padrão e as amostras diluídas). As placas foram, posteriormente, colocadas a 4 °C durante 10 minutos e em seguida, incubadas a 105 °C durante 20 minutos. Após o aquecimento, foram colocadas à temperatura ambiente durante 20 minutos e seguidamente, foi lida a absorvância a 620 nm. Cada amostra foi realizada em triplicado.

2.3. Adsorção da CMC à superfície da celulose bacteriana

A adsorção da CMC foi feita em soluções aquosas com diferentes concentrações: 0,1; 0,5 e 2,5 mg/ml. Para preparar estas soluções, a CMC foi dissolvida em solução tampão NaOAc 50 mM e pH 5 com força iônica ajustada para 50 mM com NaCl. As soluções ficaram a dissolver durante a noite.

Antes da adsorção, as membranas foram secas e pesadas. A adsorção foi feita em 10 ml de solução a diferentes temperaturas (25, 55 e 77-80°) e durante três tempos (1, 2 e 6h). Após isto, as membranas foram retiradas das soluções de CMC e colocadas em solução tampão NaOAc durante 72h.

Depois de lavadas, estas foram pesadas, colocando primeiro em papel absorvente para retirar o excesso de solução, e secas, para posterior pesagem.

2.4. Caracterização das membranas de CB

De forma a ser possível comparar o efeito da adição das diferentes concentrações de CMC e os diferentes meios como substratos, as membranas foram caracterizadas pelos métodos que se descrevem de seguida. Para realizar estes ensaios, utilizaram-se as membranas produzidas, lavadas e secas referidas anteriormente.

2.4.1. “Swelling” (inchamento)

As propriedades hidrofílicas das membranas de CB foram estudadas através do grau de inchamento (*swelling*) em função do tempo. Para tal, foram cortados discos de 13 mm de diâmetro das membranas e pesados. Em seguida, os discos foram colocados em Erlenmeyers contendo 20 ml de solução tampão fosfato-salino (Phosphate buffered saline – PBS) e deixados à temperatura ambiente. Em diferentes tempos pré-estabelecidos, os discos foram retirados dos balões com o auxílio de uma pinça, cuidadosamente enxugados em papel absorvente para retirar o excesso de solução e pesados. Os tempos para pesagem foram: 2, 10 e 30 min e 1, 2, 3, 4, 20 e 24 h [98][99].

2. Materiais e métodos

2.4.2. Medição de ângulos de contacto

Para a medição dos ângulos de contacto, formados na superfície das membranas de celulose bacteriana, foi utilizado o método da gota séssil com o auxílio do aparelho da marca OCA 15 PLUS (DATAPHYSICS). Uma imagem da gota na superfície foi capturada por uma câmara CCD (dispositivo de carga acoplada) e o ângulo foi calculado após ajuste do contorno da gota a uma elipse. Todas as medições foram efetuadas à temperatura ambiente e com água. Em todas as réplicas foram feitas 2 ou 3 medições, utilizando-se amostras com 13 mm de diâmetro.

2.4.3. Espessura

A medição da espessura das membranas de CB foi feita através de um medidor de espessura da marca Mytutoyo. Em cada membrana foi medida a espessura em 6 posições, com o objetivo de verificar a sua uniformidade.

2.4.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

As membranas de CB secas foram analisadas por FTIR-ATR (espectroscopia de infravermelho - reflectância total atenuada), utilizando o espectrómetro do modelo Alpha-P da Brucker, obtendo-se os espectros da estrutura química das membranas analisadas.

2.5. Cálculos

A produção de celulose foi calculada pela equação seguinte:

$$CB \text{ (g/l)} = \frac{m_{CB}}{V_{\text{meio}}}$$

onde m_{CB} é a massa de celulose produzida e V_{meio} é o volume de meio.

O rendimento CB/Substrato ($\eta_{CB/S}$) foi calculado pela expressão:

$$\eta_{CB/S} (\%) = \frac{m_{CB}}{m_{substrato}} \times 100$$

4

onde m_{CB} é a massa de celulose produzida e $m_{substrato}$ é a massa de substrato, isto é, a massa da fonte de carbono.

Para o cálculo do grau de *swelling* foi utilizada a seguinte equação:

$$S(t) (\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100$$

5

onde M_t é a massa da amostra no tempo t e M_0 é a massa da amostra seca [100–102].

Foi feita análise estatística (Anova e Teste de Comparação Múltiplo de Tukey) aos resultados obtidos.

3. Resultados e discussão

No trabalho apresentado, as membranas de celulose bacteriana produzidas por duas estirpes de *G. xylinum* (ATCC 53582 e 700178) em dois meios de cultura (HS e melaço) foram modificadas através de duas técnicas diferentes: *in situ* (durante fermentação) e *ex situ* (após produção). Diferentes concentrações de CMC foram utilizadas, estudando-se os efeitos na produção e estrutura morfológica e química das membranas.

3.1. Modificação *in situ*

3.1.1. Produção de celulose bacteriana

Na Figura 8 são apresentadas fotografias das membranas obtidas após lavagem. Pode-se verificar que o aspeto que as membranas apresentam é bastante gelatinoso. Podem também ser observadas as diferenças na espessura das membranas, onde se verifica que a maior produção ocorreu no meio HS com a estirpe ATCC 53582 (maior espessura). As membranas obtidas para as outras condições de produção tem uma espessura muito semelhante entre si. Para além disso, é necessário referir que as membranas obtidas não eram totalmente lisas e uniformes. Isto poderá indicar uma distribuição heterógena do polímero na matriz de CB.

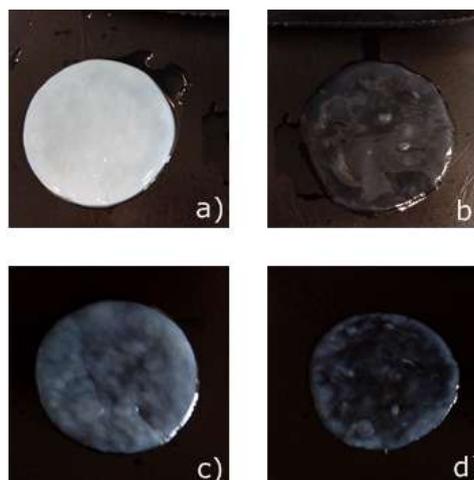


Figura 8: Membranas de celulose bacteriana produzidas: a) estirpe 53582 em meio HS; b) estirpe 53582 em meio de melaço; c) estirpe 700178 em meio HS; d) estirpe 700178 em meio de melaço

Na Figura 9 representa-se a produção de celulose (em massa seca), para as diferentes condições de cultura e percentagens de CMC adicionada no meio. A produção de CB, como já

3. Resultados e discussão

mencionado, foi superior para a fermentação da estirpe ATCC 53582 em meio HS, variando entre 6,1 e 6,7 g/l. A produção de celulose em meio HS pela estirpe ATCC 700178 foi bastante inferior, encontrando-se entre 1,4 e 2 g/l. Este meio tinha glucose como fonte de carbono e CSL como fonte de azoto.

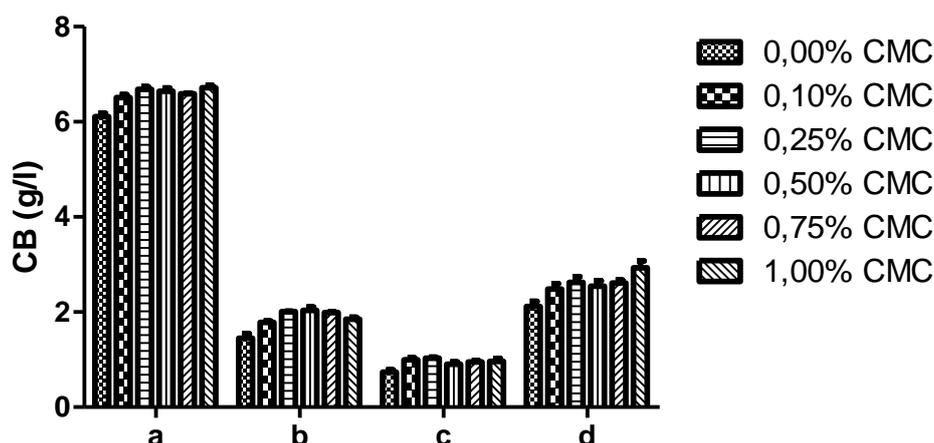


Figura 9: Produção de celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melaço; d – ATCC 700178 em meio de melaço

Existem diferentes resultados relatados por diferentes autores sobre a produção de CB utilizando glucose como fonte de carbono. Çoban e Biyik [103] estudaram o efeito de diferentes pH e temperaturas na produção de CB por duas estirpes diferentes. Em meio contendo glucose, a maior produção foi obtida para um pH de 6,5 (0,040 e 0,035 g/L, *A. pasteurianus* HBB6 e *A. lovaniensis* HBB5, respetivamente). Jung *et al.* [74] obtiveram uma produção de 1,29 g/l de CB pela *Acetobacter* V6 quando utilizaram 2% de glucose como fonte de carbono. Keshk *et al.* [2] compararam a utilização de glucose e melaço obtendo, para o meio com glucose, uma película de 1,34 g de peso. Comparando os resultados obtidos com os diversos estudos existentes, verifica-se que a produção obtida pela estirpe ATCC 53582 é superior aos valores encontrados na literatura e a produzida pela ATCC 700178 está entre os valores já relatados.

No entanto, os diversos autores que utilizaram como fonte de carbono glucose para a produção de CB, justificam os baixos valores de produção com a conversão do excesso de glucose em gluconato. Estes autores [74][78][103] estudaram a variação do pH ao longo da fermentação, verificando que este diminui para valores de 2-3 quando ocorre a formação dos ácidos acético e glucónico. Estes ácidos formam-se devido ao metabolismo da bactéria *G. xylinus*

ser respiratório, o que envolve a oxidação do etanol a ácido acético e a conversão de glucose em ácido glucónico [38][71][75][104]. Esta diminuição do pH tem efeitos negativos na produção de CB, uma vez que o pH ótimo de crescimento da bactéria encontra-se entre 4 e 6 [38][105–107]. Um estudo sobre a variação da concentração inicial de glucose no meio foi feito por Masaoka *et al.* [108] e mostra que o rendimento de CB para concentrações iniciais de 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 g/l foi de 100, 100, 68 e 28%, respetivamente. Neste estudo não é possível concluir sobre a formação destes ácidos pois não foi analisado o pH no final da fermentação.

Em relação à produção de CB em meio melaço, este continha como fonte de azoto, além do CSL, sulfato de amónia. Na Figura 9 pode-se verificar que a estirpe ATCC 53582 foi capaz de produzir entre 0,6 e 1,1 g/l enquanto a estirpe ATCC 700178 produziu entre 1,9 e 3,2 g/l. É evidente, pelos resultados obtidos, que o melaço no seu estado puro não é uma boa fonte de carbono para a produção de CB. No entanto, estudos já feitos sobre o uso de melaço mostram o contrário quando se aplica um pré-tratamento neste antes da fermentação. Isto porque o melaço contém substâncias indesejáveis, como metais pesados e componentes desconhecidos, que causam problemas durante a fermentação, inibindo o crescimento do microrganismo, influenciando o pH do substrato, além de que são capazes de inativar as enzimas associadas à biossíntese do produto [109][110].

Jung *et al.* [74] testaram dois pré-tratamentos em melaço de cana-de-açúcar para a produção de CB pela *Acetobacter* V6. A maior produção foi obtida quando um tratamento com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ foi feito ao melaço (2,09 g/l), quando comparado com os resultados obtidos para o melaço não tratado e o tratamento com H_2SO_4 (1,51 e 1,93 g/l, respetivamente), no mesmo estudo. O tratamento com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ permitiu a remoção seletiva de metais pesados, como ferro e zinco [111], mostrando que o melaço sem estes metais é benéfico para a produção de celulose. Também Bae e Shoda [109] testaram dois pré-tratamentos em melaço de cana-de-açúcar para a produção de CB pela *Acetobacter xylinum* BPR2001. O estudo mostra que o melaço sujeito a um tratamento com H_2SO_4 aumentou em 76% a concentração de celulose, quando comparado com os resultados do melaço não tratado. Este tratamento permite hidrolisar a sacarose em glucose e frutose. Assim, o facto de este tratamento ter aumentado a concentração de CB, permite concluir que estes açúcares são mais adequados para a produção de celulose bacteriana pela estirpe estudada. Para além do pré-tratamento, também variaram a concentração inicial de açúcares no meio de 20 a 70 g/l. O valor máximo de concentração de CB (5,3 g/L) foi observado para a concentração de 20 g/l. O estudo feito com melaço de

3. Resultados e discussão

beterraba usando *Glucanacetobacter xylinum* ATCC 10245 por Keshk *et al.* [2] mostra que a produção de celulose obtida usando melaço é superior ao obtido quando se utiliza glucose como fonte de carbono (1,75 e 1,34 g, respetivamente). A baixa produção de celulose bacteriana no melaço pode estar relacionada com a preferência das estirpes utilizadas por fontes de carbono como glucose, uma vez que o melaço utilizado era composto, maioritariamente, por sacarose.

O uso de sulfato de amónia como fonte de azoto também pode ter influência na produção de celulose. A concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizada neste trabalho foi de 1%, no entanto, Sone *et al.* [73] mostraram que a produção máxima de CB é obtida quando uma concentração de 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é adicionada ao meio. Para concentrações inferiores e superiores a produção diminui. Yodsuwan *et al.* [112] estudaram o efeito de diferentes fontes de azoto, num meio com sucrose como fonte de carbono, concluindo que o uso isolado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ produz baixo rendimento de celulose. Estes autores também concluíram que o uso de extrato de levedura conjugado com qualquer outra das fontes de azoto estudadas produz elevados rendimentos, não existindo grandes diferenças entre eles. Resultados semelhantes foram relatados por Dudman [113], que indica que o aumento de concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ diminui o crescimento de CB.

A adição de diferentes concentrações de CMC ao meio de cultura também foi estudada. A análise estatística mostra que quando se compara os meios com adição de CMC e o controlo – 0% CMC – existem diferenças significativas (*valor* $p < 0,05$) na produção, à exceção do meio de melaço com a estirpe ATCC 700178, onde só existem diferenças significativas quando o meio com 1% é comparado com o controlo. Em relação às diferentes concentrações de CMC, quando comparadas entre si, não apresentam diferenças ($p > 0,05$). No entanto, estudos já feitos mostram que a adição de CMC com baixas concentrações pode ser favorável para a produção de CB. Cheng *et al.* [114] mostraram que a produção pela estirpe ATCC 700178 num meio agitado de Frutose e CSL, melhorava com o aumento da concentração de CMC e atingia a saturação por volta de 1% (8,2 g/L). Este aumento na produção de celulose pode ocorrer devido ao aumento na taxa de crescimento celular ou como resultado da incorporação do aditivo na membrana de CB [115]. O aumento da produção de CB com adição de CMC no meio de cultura varia com o grau de polimerização e o grau de substituição deste polímero [31].

Também foi feita uma análise estatística (Teste de Comparação Múltiplo de Tukey) de forma a confirmar as diferenças significativas entre as quatro condições de produção.

3.1.2. Quantificação de açúcares

De modo a avaliar o consumo de substrato necessário ao crescimento celular e, conseqüentemente, da celulose, recorreu-se ao método da antrona de forma a quantificar o consumo da fonte de carbono no meio de melação. Os resultados da concentração de açúcares no início e final da fermentação estão representados nas Figuras 10 e 11, para as duas estirpes. Para que fosse possível quantificar a quantidade de açúcares presente no melação pelo método de antrona, foi necessário fazer diluições elevadas, 1:500 para a estirpe ATCC 70173 e 1:200 para a estirpe ATCC 53582. Esta diferença nas diluições está relacionada com a concentração de melação utilizada no meio de cultivo para cada estirpe.

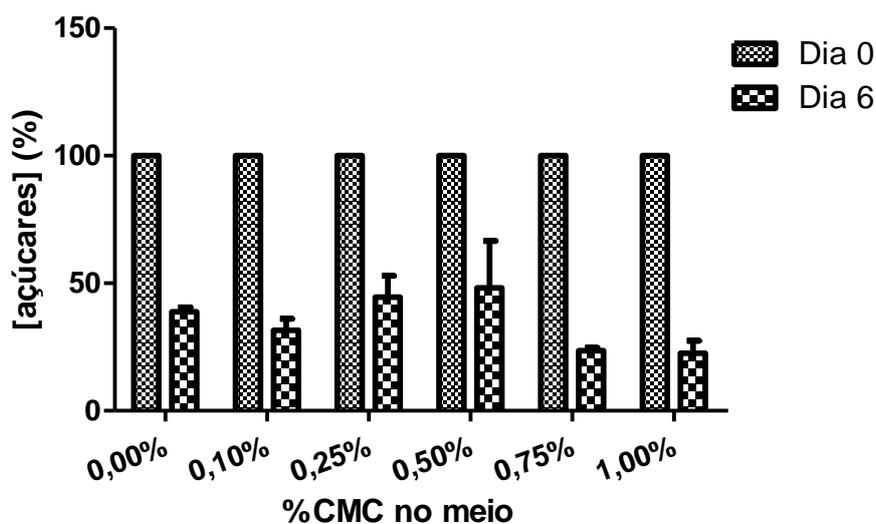


Figura 10: Concentração de açúcares no meio de cultura antes (Dia 0) e no final (Dia 6) da fermentação pela estirpe ATCC 53582

3. Resultados e discussão

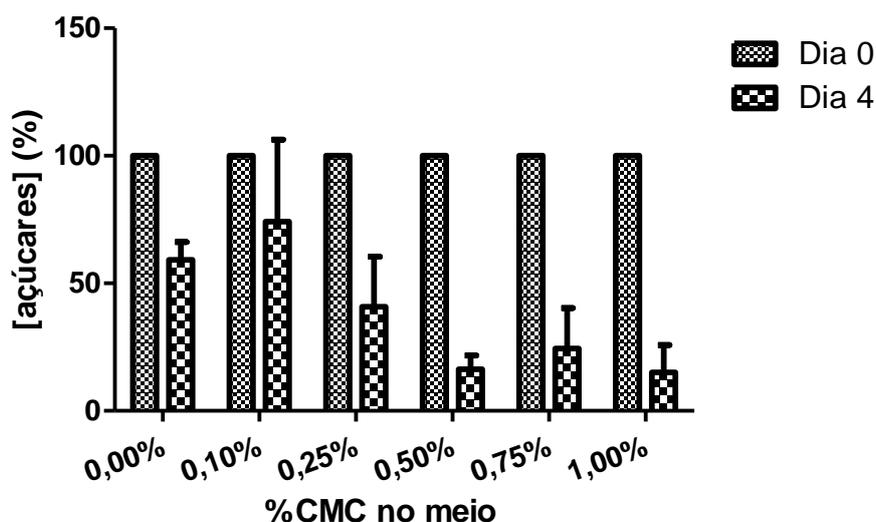


Figura 11: Concentração de açúcares no meio de cultura antes (Dia 0) e no final (Dia 4) da fermentação pela estirpe ATCC 700178

Como se verifica pelos gráficos, a bactéria consumiu glucose para produzir CB. A fermentação ocorreu durante 7 dias para as duas estirpes, no entanto, no dia 5 já não foi possível retirar uma amostra do meio de cultura da estirpe ATCC 700178 devido ao crescimento da membrana de celulose. Na Tabela 3 pode-se observar a taxa de consumo de açúcares e a percentagem consumida para as diferentes concentrações de CMC, ao fim de 5 e 7 dias de fermentação, para a estirpe ATCC 700178 e ATCC 53582, respetivamente.

Tabela 3: Consumo e taxa de consumo de açúcares no meio de melação para as duas estirpes em estudo.

% CMC	ATCC 53582		ATCC 700178	
	Taxa de consumo (mg/ml/d)	% açúcares consumida	Taxa de consumo (mg/ml/d)	% açúcares consumida
0,00%	0,89	61	5,80	42
0,10%	1,62	68	0,52	35
0,25%	1,34	56	0,33	71
0,50%	1,77	55	2,05	84
0,75%	2,67	78	1,94	83
1,00%	2398,5	78	2878,5	92

Analisando os resultados verifica-se um maior consumo de glucose para maiores concentrações de CMC na estirpe ATCC 700178, tendo ocorrido o maior consumo no meio com 1% de CMC, onde a produção de CB foi também mais elevada (2,93 g/L). A estirpe ATCC 700178 consumiu uma maior % de glucose que a outra estirpe em estudo, em apenas 5 dias de fermentação, mostrando que esta consome os açúcares do meio mais rápido.

3.1.3. Rendimento

Para além do cálculo da produção de CB nas diferentes condições, foi também calculado o rendimento obtido, podendo este ser observado na Figura 12.

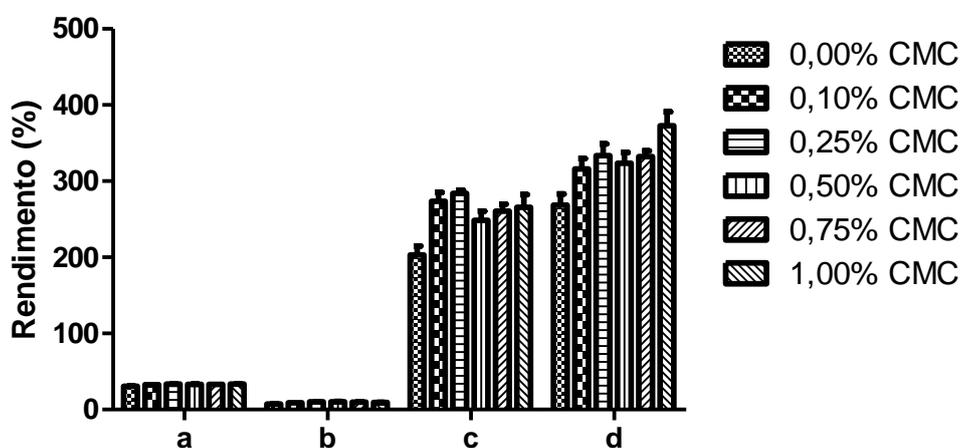


Figura 12: Rendimento obtido para a produção de celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melaço; d – ATCC 700178 em meio de melaço

Este rendimento representa a produção de CB por substrato consumido. Verifica-se um rendimento elevado quando a produção é feita em meio de melaço. Uma vez que a quantidade de glucose presente no meio de melaço (7 e 16 mg, para a estirpe ATCC 53582 e ATCC 700178, respetivamente) era bastante inferior àquela presente no meio HS (400 mg), apesar da produção ser menor para o meio melaço, o seu rendimento foi superior mostrando que o uso deste subproduto na indústria para a produção de CB é favorável. A análise estatística mostra que em quase todos os meios existem diferenças entre o controlo e o meio com diferentes concentrações de CMC, não existindo diferenças entre as várias concentrações do polímero. No caso do meio de melaço com a estirpe ATCC 700178, só se verifica diferenças significativas ($p < 0,05$) quando o controlo é comparado com o meio contendo 1% de CMC. Estatisticamente, não existem diferenças significativas no rendimento para o mesmo meio com estirpes diferentes.

3. Resultados e discussão

Já foi referido anteriormente que a alta fração de sacarose presente no melaço utilizado sugere que este não é o açúcar mais adequado para a produção de celulose pelas bactérias. No entanto, para além da presença da sacarose (37%) no melaço, este contém poucos açúcares redutores (cerca de 9%) que podem ser glucose, frutose e outros polissacarídeos. Mas tem também 48% de açúcares totais, provando que para além da sacarose, o melaço tem outros polissacarídeos, mostrando que a composição deste meio é diferente do meio HS. Assim, não é possível isolar o efeito da fonte de carbono na produção de celulose, mostrando que os restantes polissacarídeos presentes no melaço têm efeito sobre a produção de CB.

3.1.4. Espessura

A espessura das membranas produzidas também foi analisada. A espessura das membranas de CB após secagem, afeta fortemente o seu desempenho e, como tal, deve ser controlada de forma cuidadosa. Para tal, o processo de fermentação deve ser interrompido numa certa fase, de modo a que a película, após secagem, tenha uma massa dentro do intervalo desejado. A fase em que o processo deve ser interrompido é no espaço entre os 3-6 dias de fermentação pois se for interrompido numa fase muito inicial, apesar de se obter membranas finas, estas não serão tão homogêneas como se deseja. No entanto, a complexidade do processo torna a determinação do momento de interrupção difícil [116–118]. Um estudo feito por Al-Shamary *et al.* [8] mostrou que as condições de fermentação e os métodos de purificação das membranas de CB podem afetar a espessura e a porosidade destas.

A Figura 13 apresenta a espessura das membranas de CB secas, para o caso da fermentação das diferentes estirpes nos diferentes meios e com as várias concentrações de CMC.

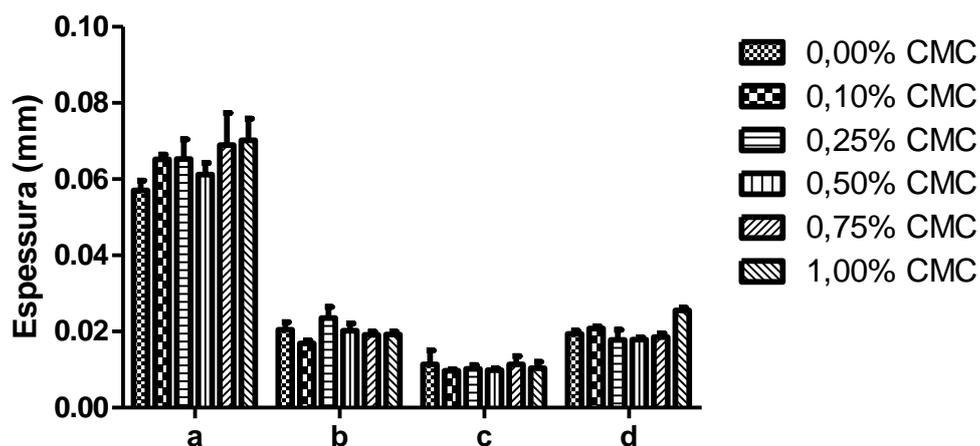


Figura 13: Espessura das membranas de celulose bacteriana produzidas: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melaço; d – ATCC 700178 em meio de melaço

Como já foi observado na Figura 8, as membranas mais espessas foram produzidas em meio HS pela estirpe ATCC 53582, podendo verificar-se o mesmo pela Figura 13a onde os valores de espessura, após secagem, variam entre 0,057 e 0,70 mm. A condição em estudo que produziu menor CB (meio de melaço com a estirpe ATCC 53582) também foi aquela onde se obtiveram membranas menos espessas (0,10-0,12 mm). Os resultados obtidos por Al-Shamary variavam entre 20 e 60 μm estando concordantes com os resultados obtidos neste estudo [8].

Com a análise estatística (Teste de Comparação Múltiplo de Tukey) concluiu-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) na espessura da membrana produzida para cada condição, no entanto, não existem diferenças significativas quando o CMC é adicionado ao meio.

3.1.5. Grau de *swelling*

A teoria sobre o grau de *swelling* de um polímero foi desenvolvida por Flory e Rehner em 1943 [119], que consideraram que a capacidade de *swelling* depende do grau de interação entre as moléculas de solvente e do polímero. Para além disso, a capacidade de *swelling* está

3. Resultados e discussão

também relacionada com a estrutura da membrana de CB, isto é, quanto maior o tamanho dos poros existentes nesta, maior será a capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, maior o grau de *swelling*.

De forma a avaliar o grau de *swelling* das membranas produzidas, foi necessário conhecer a massa da membrana de CB seca e húmida. Para tal, amostras das membranas secas ao ar foram colocadas em contato com PBS durante 24h e o seu grau de *swelling* foi determinado para tempos de pesagem estipulados.

Nas figuras 14 à 17 são apresentados os resultados obtidos para o grau de *swelling* em função do tempo de imersão. Para além destes resultados, a Tabela 4 apresenta os valores obtidos no final de imersão, 24h, das membranas.

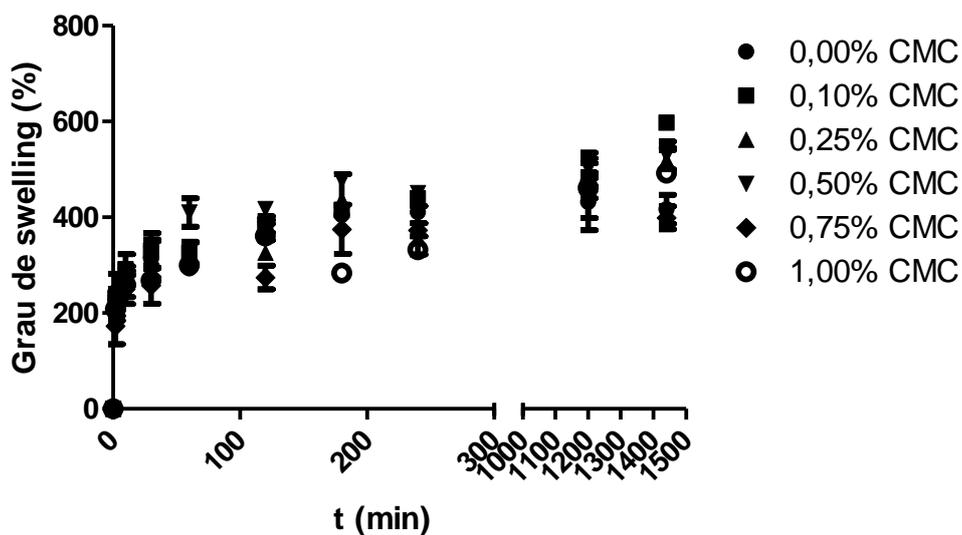


Figura 14: Grau de *swelling* ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 53582 em meio HS

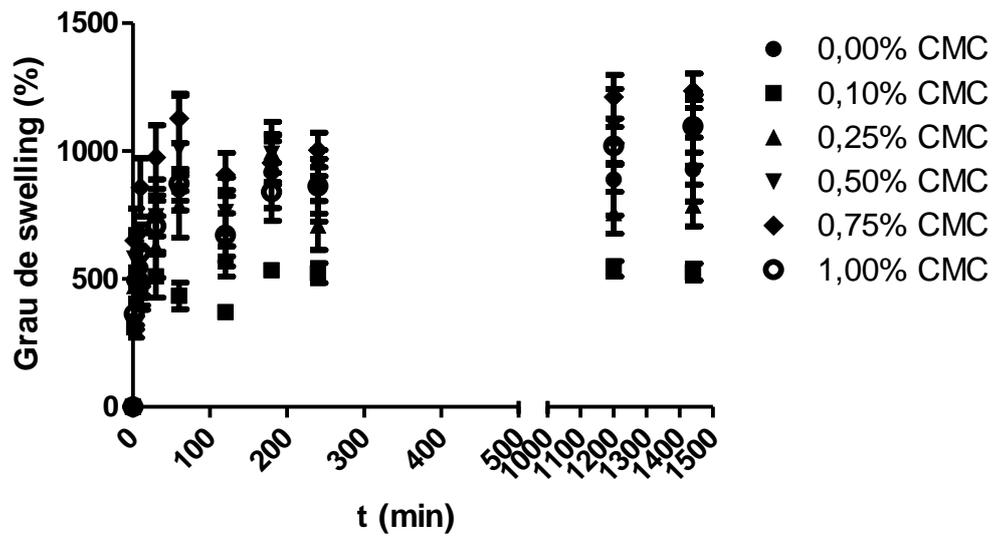


Figura 15: Grau de *swelling* ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 700178 em meio HS

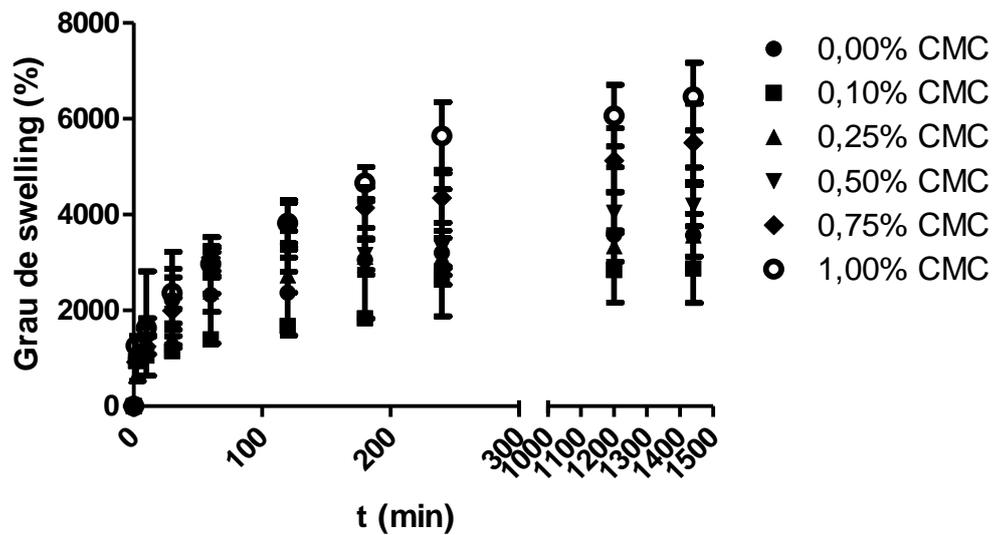


Figura 16: Grau de *swelling* ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 53582 em meio de melão

3. Resultados e discussão

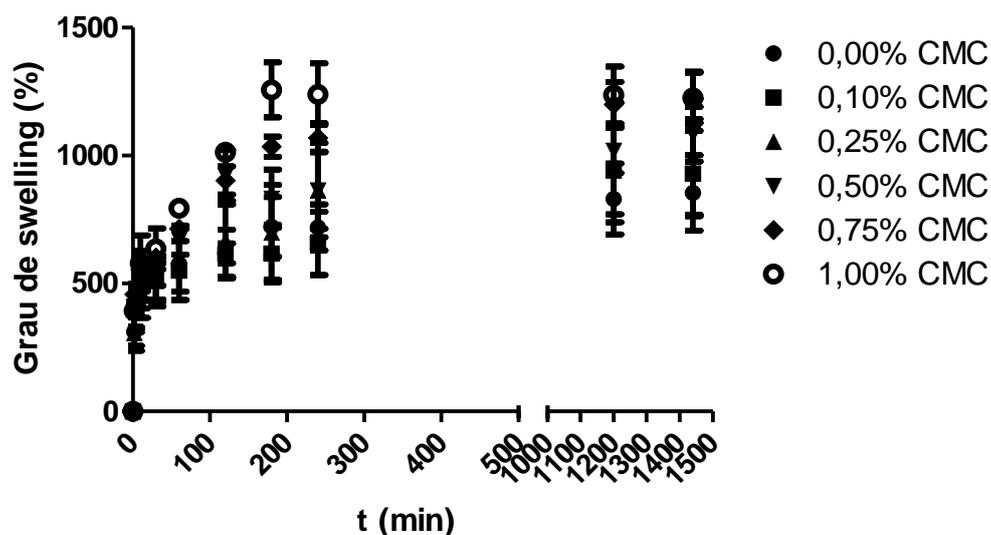


Figura 17: Grau de *swelling* ao longo do tempo para a Estirpe ATCC 700178 em meio de melaço

Tabela 4: Grau de *swelling* obtido para as diferentes condições após 24h de imersão em PBS

% CMC	Meio HS		Meio Melaço	
	ATCC 53582	ATCC 700178	ATCC 53582	ATCC 700178
0,00%	417	928	3572	854
0,10%	598	527	2876	930
0,25%	519	788	3569	996
0,50%	529	1082	4188	1084
0,75%	399	1236	5500	1236
1,00%	492	1097	6461	1226

A análise estatística mostrou que a adição de diferentes concentrações de CMC ao meio de cultura não teve diferenças no grau de *swelling* ($p > 0,05$), podendo-se observar isso nas figuras anteriores. Através desses gráficos é possível verificar que no final de 24h foi atingido o equilíbrio. Apesar de Cheng *et al.* [114] estudarem a retenção de água e não o grau de *swelling*, os resultados obtidos por estes autores estão de acordo com os obtidos. Estes mostraram que a retenção de água foi cerca de 98% em meio HS, tanto no controlo como quando diferentes concentrações de CMC foram adicionadas ao meio. No entanto, um estudo feito por Blomstedt [120] mostra que a quantidade de retenção de água aumenta com a adição de CMC.

Em relação à Tabela 4, comparando os valores obtidos para os dois meios em estudo, observa-se que há um aumento do grau de *swelling* quando o meio de cultivo é o melaço, mostrando que este meio produz membranas mais hidrofílicas que as produzidas em meio HS.

O estudo feito por Junge *et al.* [74] mostrou que as membranas de CB produzidas em meio de melaço tinham uma cristalinidade mais baixa que a observada para as membranas produzidas num meio com glucose pura como fonte de carbono (67,27 e 83,02 %, respetivamente). Também Keshk *et al.* [121] mostraram que o uso de melaço como meio de cultivo diminui a cristalinidade das membranas de celulose bacteriana quando comparada com o meio HS. Uma vez que a cristalinidade tem uma relação inversamente proporcional com a porosidade da superfície da celulose, quanto mais baixa esta for, maiores são as dimensões dos poros presentes na estrutura da celulose. O facto de os poros aumentarem, permite que uma maior quantidade de moléculas de água penetre e seja absorvida pela membrana, aumentando a sua hidrofiliçidade [98][122].

Em resumo, é possível concluir que a adição de CMC ao meio de cultura não teve influência no grau de *swelling* das membranas mas o meio de cultura em que estas foram produzidas influenciou a sua microestrutura, alterando a hidrofiliçidade da mesma.

3.1.6. Avaliação da hidrofiliçidade

De forma a avaliar o carácter hidrofílico/hidrofóbico das membranas de CB modificadas com CMC, realizou-se a medição de ângulos de contato formados na superfície do substrato por um líquido de referência polar, a água, através do método da gota séssil. Através da medição dos ângulos é possível avaliar as alterações na hidrofiliçidade das membranas para as diferentes condições estudadas. Quando o ângulo de contato com a água é elevado, a superfície é hidrofóbica, sendo que uma superfície hidrofílica permite que a gota de água se espalhe e, assim, se obtenha um ângulo de contato mais baixo. Na Figura 18 observa-se um aumento dos ângulos de contato com o aumento de CMC no meio, à exceção de alguns dados discrepantes. No entanto, a análise estatística mostra que apenas existem diferenças significativas no meio HS com a estirpe ATCC 700178.

3. Resultados e discussão

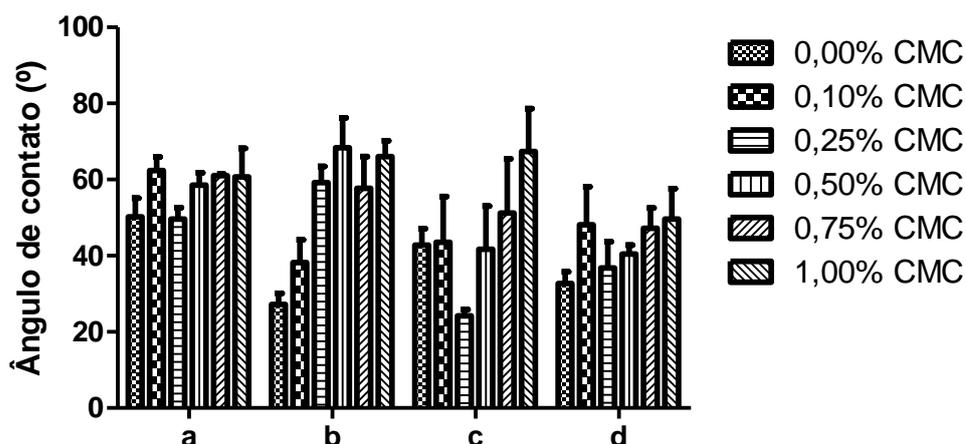


Figura 18: Ângulos de contato das diferentes concentrações de CMC na celulose bacteriana: a – ATCC 53583 em meio HS; b – ATCC 700178 em meio HS; c – ATCC 53583 em meio de melão; d – ATCC 700178 em meio de melão

Analisando os resultados, verifica-se que as membranas de celulose bacteriana pura, ou controle, têm carácter hidrofílico estando em concordância com o descrito por Pértile [9] e por Klemm *et al.* [25].

O aumento da concentração de CMC no meio de cultura apenas provocou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quando o meio em estudo foi o HS com a estirpe ATCC 700178, onde se verificam diferenças entre o controlo e as diferentes concentrações de CMC. Observa-se um aumento do ângulo de contato com o aumento de CMC, mostrando que a adição deste polímero diminui a hidrofiliicidade da membrana. No entanto, estes resultados não estão em concordância com o descrito por Hong [59]. Este autor refere que a adição de CMC deveria aumentar os grupos carboximetil na estrutura da celulose e assim aumentar a hidrofiliicidade, pois estes atuam como grupos hidrofílicos. O facto das membranas produzidas não serem totalmente lisas e uniformes, pode ter influenciado na medição dos ângulos de contato e daí os elevados valores nos desvios-padrão pois, para a mesma amostra, eram obtidos valores bastante discrepantes.

Nas Figuras 19 e 20 podem ser observados dois exemplos de ângulos de contato obtidos, numa membrana com carácter hidrofílico e outro hidrofóbico, respetivamente.



Figura 19: Gota obtida para medição de ângulo de contacto na membrana de CB no meio HS pela estirpe ATCC 700178 sem adição de CMC

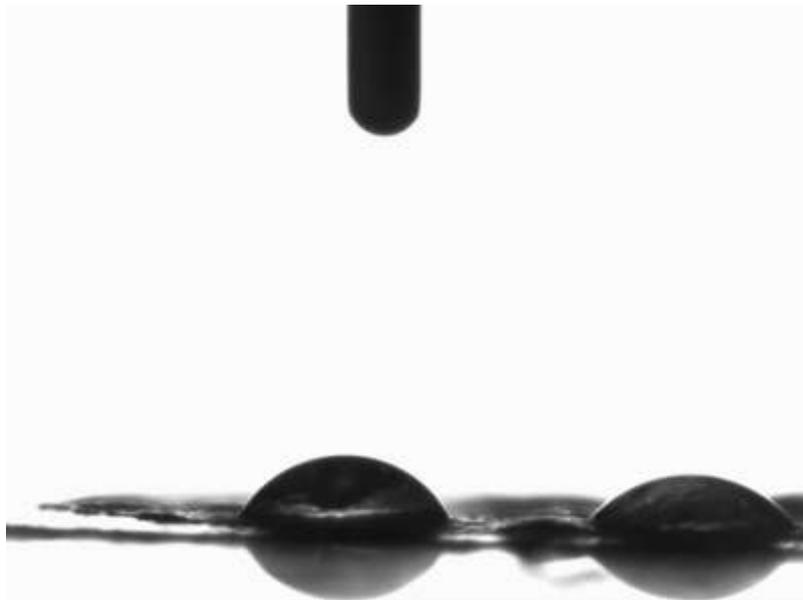


Figura 20: Gota obtida para medição de ângulo de contacto na membrana de CB no meio HS pela estirpe ATCC 53582 com 0,75% de CMC no meio

Apesar da análise estatística mostrar que não existem diferenças significativas entre as diferentes condições de fermentação ($p > 0,05$), os resultados obtidos para o meio de melação mostram ser inferiores aos do meio HS, indicando um aumento na hidrofiliicidade neste meio. Estes resultados estão de acordo com o obtido para o grau de *swelling*, mostrando que o meio de cultivo influencia a estrutura das membranas produzidas.

3. Resultados e discussão

3.1.7. FTIR

De forma a obter a caracterização da estrutura química das membranas produzidas, estas foram sujeitas a análise por FTIR. Esta análise permite confirmar a presença de alterações específicas dos grupos funcionais presentes nas membranas, permitindo concluir se ocorreram modificações químicas na estrutura.

Visualizando o espectro obtido para a CMC, Figura 21, observa-se um pico mais amplo que os restantes na região 3400-3200 cm^{-1} correspondente às vibrações de alongamento dos grupos -OH da celulose. Isto é particularmente útil para explicar os padrões das ligações de hidrogénio, uma vez que, em casos favoráveis, cada grupo hidroxilo distinto apresenta uma banda que se estende a uma frequência que diminui com o aumento da força da ligação de hidrogénio [12][123]. Para além deste, observa-se outros picos: um aproximadamente aos 2894 cm^{-1} correspondente às regiões de alongamento dos grupos -CH [124][125], outro na região dos 1590 cm^{-1} que confirma a presença de grupos carboxila [126]. Os picos observados nas regiões perto de 1415 e 1320 cm^{-1} são atribuídos a grupos metilo e hidroxilo, respetivamente, [125][127] e o pico observado na região do 1021 cm^{-1} corresponde às vibrações de torção do grupo CH_2 [128].

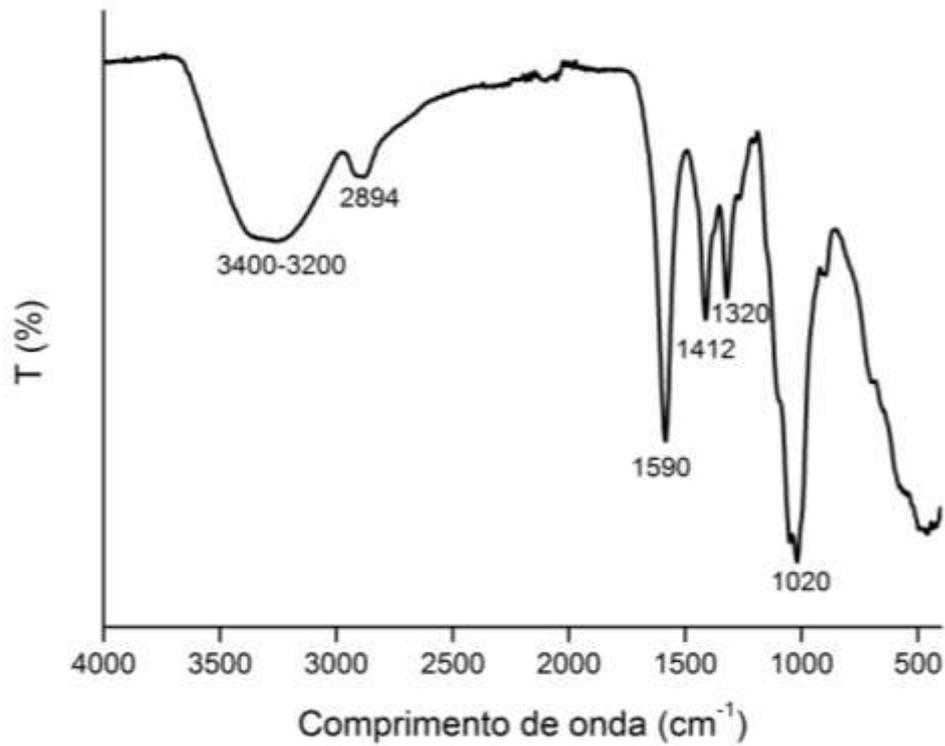


Figura 21: Espectro da amostra de CMC obtido por FTIR

Nas Figuras 22 e 23 podem ser observados os espectros obtidos para as amostras de CB modificadas com CMC.

3. Resultados e discussão

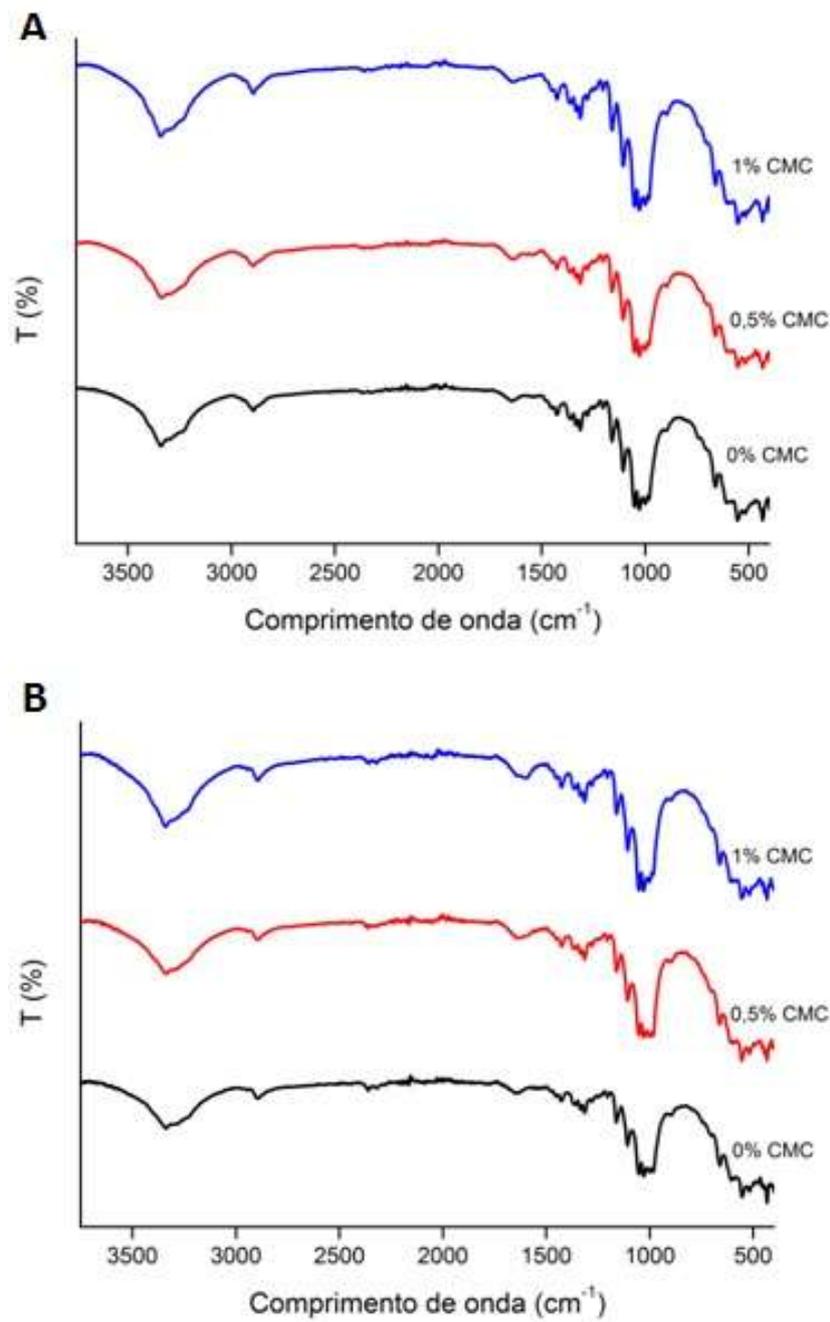


Figura 22: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 53582 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melação

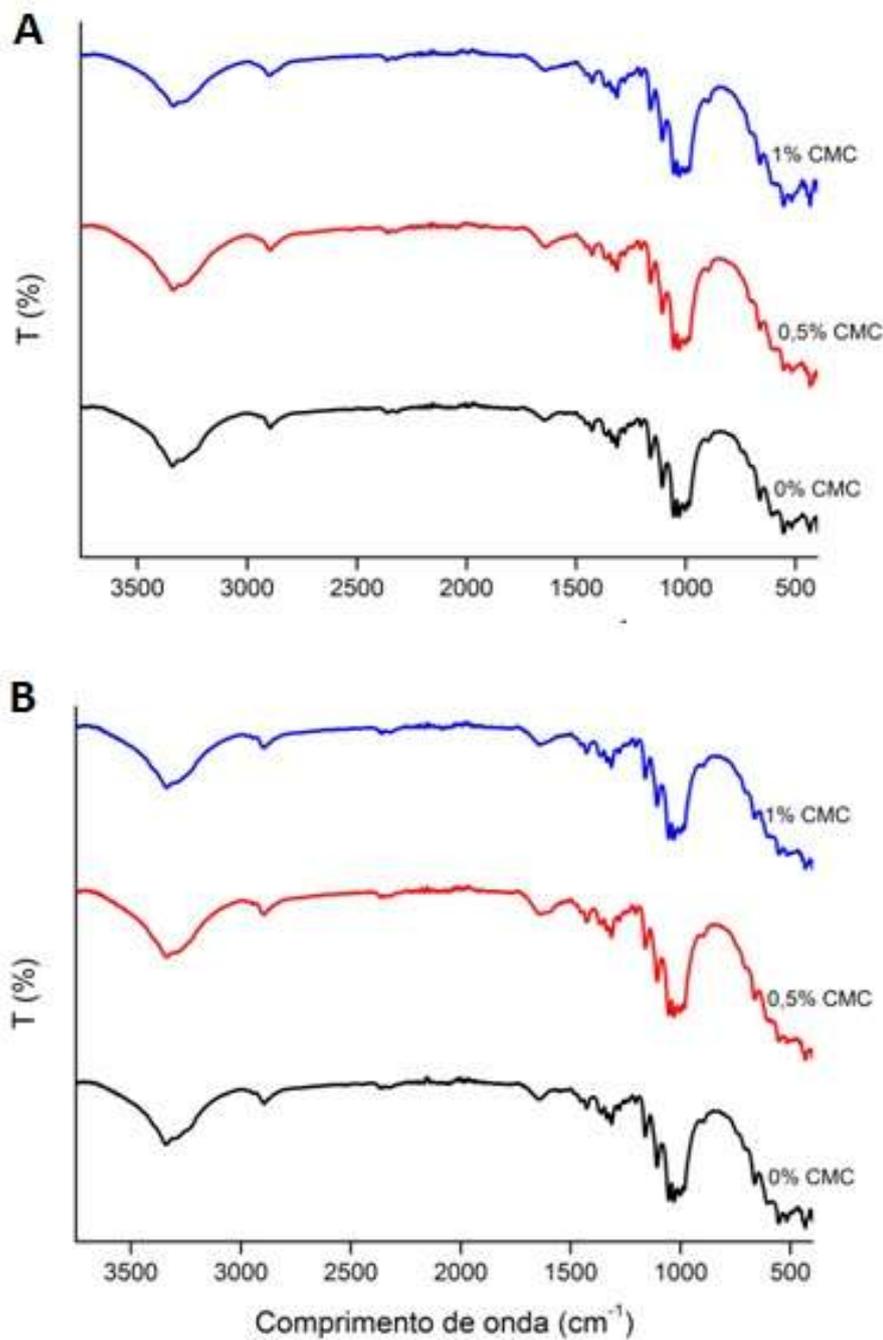


Figura 23: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 700178 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melação

Observando as Figura 22 e 23, verifica-se que não existem diferenças entre os vários espectros analisados. Apesar de se observar o pico na região dos 1590 cm⁻¹ nos espectros onde foi incorporada CMC, este pico também aparece no espectro da celulose indicando que esta não foi incorporada nas membranas.

3. Resultados e discussão

Apesar de não ser perceptível nas figuras, existe um pequeno pico, nas amostras de 0% de CMC, na região dos 3240 cm^{-1} atribuída à celulose I [12], que desaparece quando é adicionado CMC ao meio. Isto implica que adição de CMC no meio diminui o teor de celulose I, no entanto, um estudo feito por Carrilo *et al.* [129] mostra que a presença de picos nas regiões de 3488 e 3447 cm^{-1} são encontrados na celulose II. Observando as Figuras 22 e 23, a ausência destes picos nos espectros mostram que a adição de CMC não alterou a celulose de I para II.

3.2. Modificação *ex situ*

A análise da modificação *ex situ* também foi estudada. Como tal, foram produzidas membranas em meios sem adição do CMC, que foram posteriormente cortadas em discos de 13 mm de diâmetro, secas e modificadas. Cada disco modificado, foi utilizado para caracterizar as membranas pelos diferentes métodos: medição de ângulos de contato e grau de *swelling*. As membranas modificadas a 20 °C foram ainda analisadas por FTIR, para 1 e 6h de contato com as soluções de CMC.

Para o estudo da modificação *ex situ* foram avaliados três parâmetros diferentes: temperatura, tempo de contato com as soluções de CMC e a concentração destas.

3.2.1. Efeito da temperatura

As modificações na hidrofiliicidade das membranas, através dos ângulos de contato e do grau de *swelling* foram analisadas. Na Tabela 5 estão os ângulos de contato obtidos para as diferentes temperaturas em função do tempo de contato com as soluções de CMC.

Tabela 5: Ângulo de contato calculados para as diferentes condições de fermentação ao longo do tempo e para as diferentes temperaturas estudadas

		1h	2h	6h
ATCC 53582 Meio HS	20°	49,6	31,75	25,6
	50°	49,1	31,3	34,1
	80°	39,1	27,4	29,7
ATCC 53582 Meio Melaço	20°	48,45	29,2	31,9
	50°	44	33,4	-

	80°	56,75	30,7	-
ATCC 700178 Meio HS	20°	74,9	39,55	25,9
	50°	44,25	49,95	34
	80°	55,35	26,2	-
ATCC 700178 Meio Melaço	20°	83,5	26,8	-
	50°	64,1	41	-
	80°	79,6	82,5	41,2

Como se verifica, os ângulos diminuem ao longo do tempo, mostrando o aumento de hidrofiliidade provocado pela modificação das membranas. Não foi possível medir o ângulo de contato de algumas amostras quando o tempo de imersão na solução de CMC foi de 6h. Isto porque quando a gota de água era deixada na superfície da membrana era de imediato absorvida por esta, mostrando elevado carácter hidrofílico. Em relação ao efeito da temperatura, observa-se que esta não tem um efeito linear para as diferentes amostras, observando-se que o aumento desta pode afetar positiva ou negativamente a hidrofiliidade das membranas de CB.

Quando se comparam os resultados obtidos para os dois meios, observa-se valores mais baixos para o meio de melaço, nas duas estirpes. E em relação às estirpes estudadas, aquela em que se observam valores de ângulo de contato mais baixo, e conseqüentemente maior adsorção, é a estirpe ATCC 700178.

Em relação ao grau de *swelling*, a Figura 24 mostra os resultados obtidos no final de 24h de imersão em PBS, para as diferentes condições e temperaturas.

3. Resultados e discussão

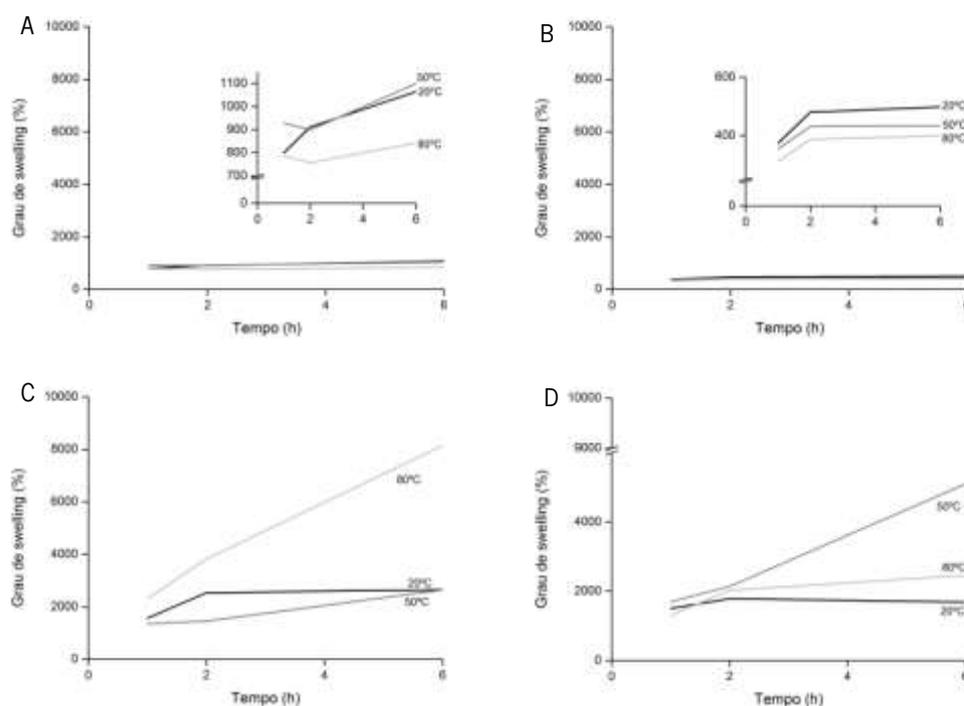


Figura 24: Variação do grau de *swelling* em função do tempo de contato com as soluções de CMC, após 24h em contato com PBS. A) ATCC 53582 em meio HS; B) ATCC 700178 em meio HS; C) ATCC 53582 em meio de melação; D) ATCC 700178 em meio de melação. Temperatura: círculo-20°; quadrado-50°; triângulo-80°

Observando a Figura 24-A e C, referentes à estirpe ATCC 53582, verifica-se que as membranas atingiram a saturação ao fim das 2h de contato com a solução de CMC para todas as temperaturas à exceção da membrana modificada a 80° no meio de melação (Figura 24-C). Em relação à outra estirpe em estudo, a saturação no final das 2h só é observada para as amostras a 20 e 80° no meio de melação (Figura 24-D), verificando que as restantes aumentam a capacidade de retenção de água até às 6h de contato com as soluções de CMC. Em relação aos meios, o meio de melação obteve valores muito superiores aos obtidos pelas membranas produzidas no meio HS. Isto significa que a adsorção de CMC foi bastante superior neste meio, mostrando que as membranas produzidas neste meio são capazes de adsorver um maior número de grupos carboximetil na sua estrutura

Quanto à variação da temperatura, verifica-se que no meio HS, a capacidade de retenção de água é superior para temperaturas mais baixas não se verificando o mesmo com as membranas produzidas em meio de melação.

Analisando os resultados obtidos para os dois métodos de caracterização, constata-se que os resultados são discrepantes entre si. É possível que estes resultados estejam associados

à heterogeneidade (regiões mais densas e mais finas na mesma membrana). Isto porque, para a análise de cada método de caracterização, foi utilizada uma amostra retirada da membrana. Se estas amostras não forem homogêneas entre si, a adsorção de CMC pode ocorrer de forma diferente, e daí os resultados entre os métodos ser discrepante para as mesmas condições.

Apesar disso, é possível concluir, pela Tabela 5 e a Figura 24, que as membranas produzidas em diferentes meios possuem estrutura diferentes, capazes de adsorver mais ou menos CMC. Neste caso, as membranas produzidas em meio de melaço são capazes de adsorver mais CMC, pois os ângulos de contato foram baixos e a capacidade de retenção de água foi muito elevada após a modificação, mostrando a adsorção do CMC nas membranas. Estes resultados são validados pelos de FTIR (discutidos mais à frente) onde se regista uma maior quantidade de CMC adsorvidas nas fibras de CB. No entanto, isto só é válido para uma das estirpes (ATCC 700178) sendo que na outra não existem grandes diferenças.

3.2.2. Efeito da concentração de CMC na solução

A variação da concentração de CMC nas soluções também foi estudada, mantendo-se constante a temperatura de 80 °C e um tempo de imersão de 2h. As concentrações usadas para o estudo foram as seguintes: 0,1; 0,5 e 2,5 mg/ml. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 25.

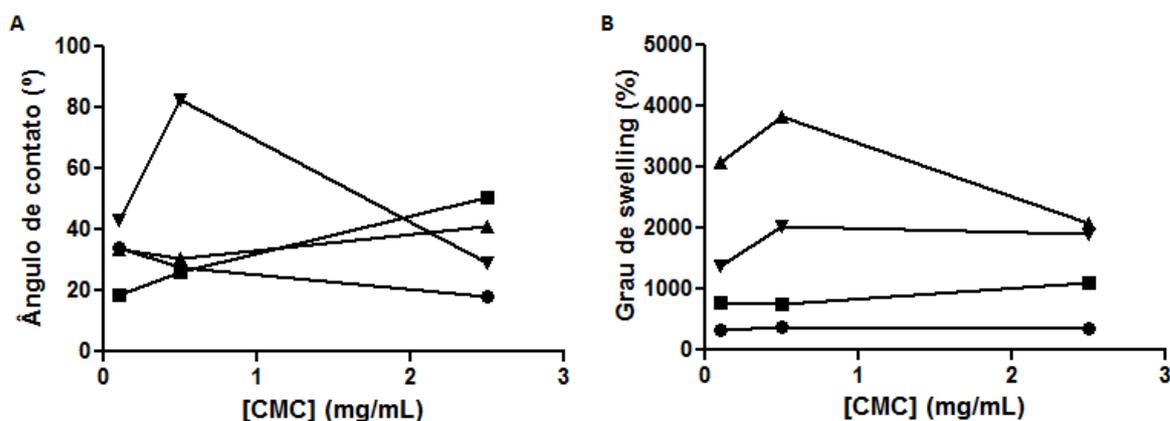


Figura 25: Caracterização das membranas de CB modificadas a 80 °C durante 2h em função da concentração das soluções de CMC. A) Variação dos ângulos de contato; B) Variação do grau de *swelling*. Circulo: ATCC 53582 em meio HS; quadrado: ATCC 700178 em meio HS; triângulo para cima: ATCC 53582 em meio de melaço; triângulo para baixo: ATCC 700178 em meio de melaço

3. Resultados e discussão

Na figura 25-A está representada a variação nos ângulos de contato para as diferentes concentrações nas soluções de CMC onde as membranas foram colocadas. À exceção das membranas produzidas pela estirpe 700178 em meio melaço, todas as restantes mostram um aumento de ângulo de contato com o aumento da concentração de CMC.

Quanto à variação do grau de *swelling* (Fig. 25-B) verifica-se que este não varia muito entre as diferentes concentrações quando as membranas são produzidas em meio HS. Já nas membranas produzidas em meio de melaço, observa-se uma variação entre as diferentes concentrações, obtendo-se maior grau de *swelling* para este meio, independentemente das condições em que ocorreu a modificação. Esta diferença de valores indica que o meio de melaço permite produzir membranas com maior afinidade de adsorção de CMC.

Em relação às concentrações de CMC utilizadas, já foi mencionado que não teve efeito sobre as membranas produzidas em meio HS, no entanto, para o meio de melaço, a maior capacidade de retenção de água foi obtida para um concentração de 0,5 mg/ml, para as duas estirpes. Para a estirpe ATCC 700178, observa-se que o grau de *swelling* aumenta quando a concentração aumenta de 0,1 para 0,5 mg/ml, sendo que depois se mantêm para a concentração mais elevada. Na outra estirpe ocorre uma diminuição do grau de *swelling* quando se aumenta a concentração da solução de 0,5 para 2,5 mg/ml. Este facto pode estar relacionado com o que foi dito anteriormente, sobre a homogeneidade das amostras modificadas.

3.2.3. FTIR

Os espectros de FTIR obtidos para as amostras modificadas *ex situ*, nas condições já indicadas podem ser observadas nas Figuras 26 e 27.

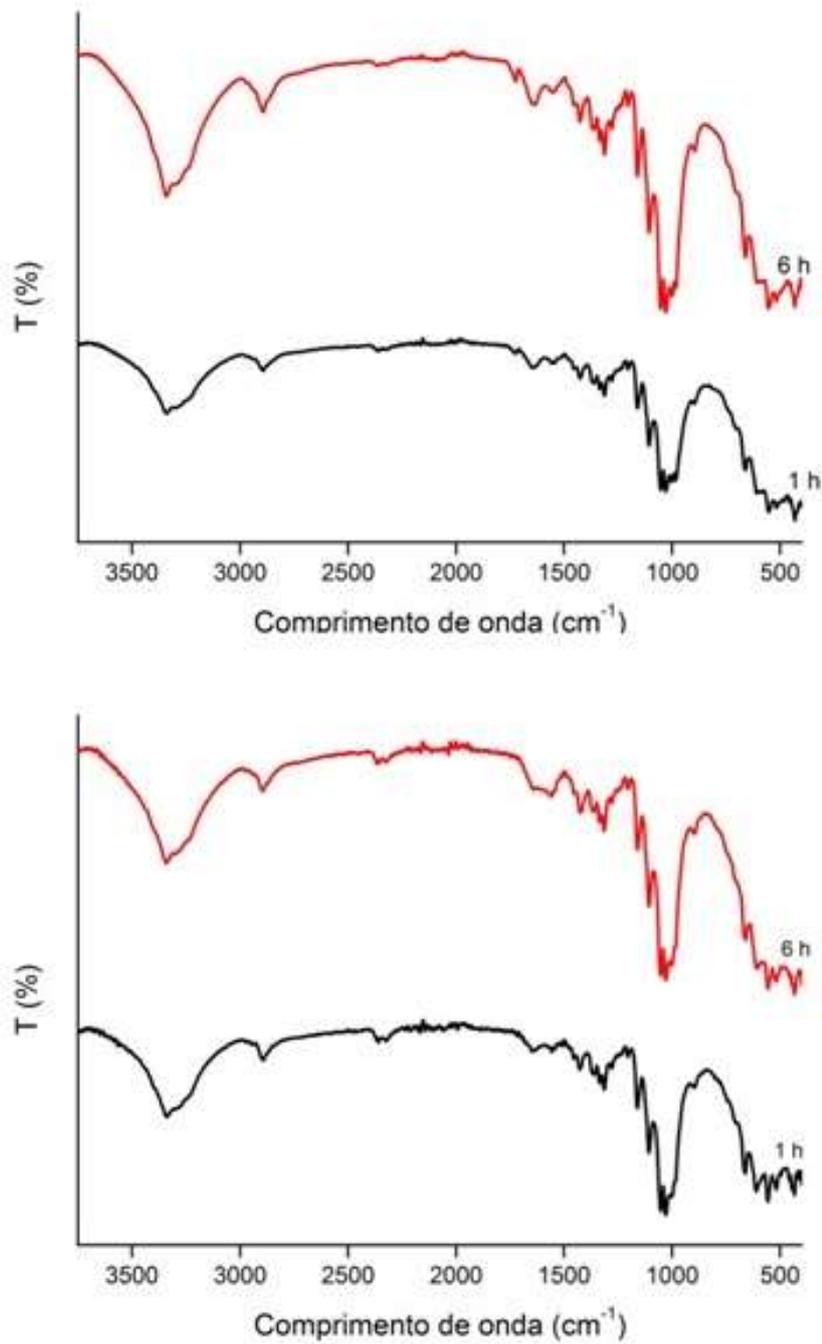


Figura 26: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 53582 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melação

3. Resultados e discussão

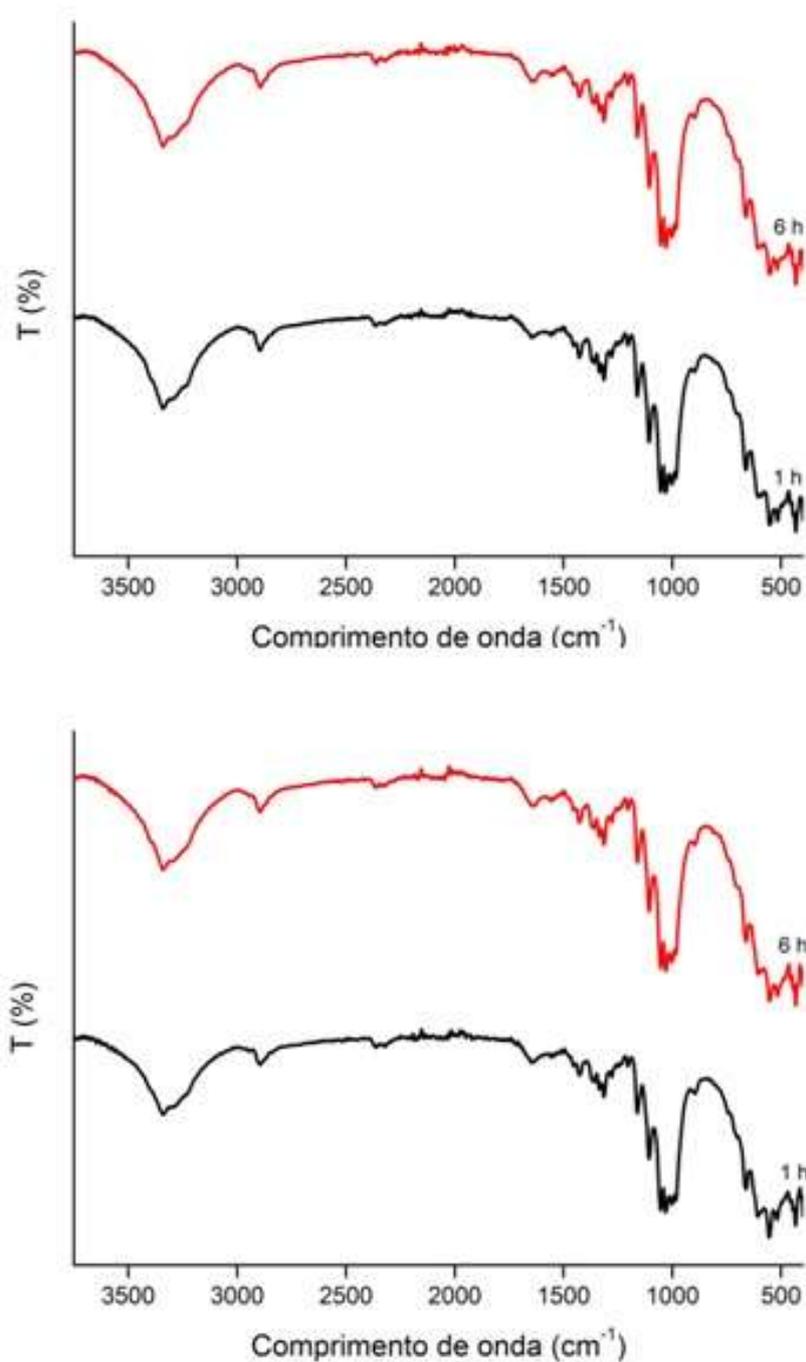


Figura 27: Espectro de FTIR obtidos para as membranas de CB produzidas pela estirpe ATCC 700178 modificadas com CMC. A) Meio HS; B) Meio de melação

Observando as Figuras 26 e 27, verifica-se que os espectros obtidos para as diferentes horas de contacto com a solução de CMC são semelhantes entre si. Apenas a estirpe ATCC 53582 produzida em mio HS apresenta alguma diferença nos picos, observando-se picos mais intensos para 6h de contacto.

Estes resultados discrepantes entre os diferentes métodos de caracterização podem estar associados ao facto de se ter modificado as amostras a analisar independentemente, ou seja, não tendo sido modificada uma membrana maior e posteriormente retiradas amostras desta para análise.

4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuro

Neste trabalho, testaram-se dois meios de cultivo com diferentes fontes de carbono para a produção de celulose bacteriana através de duas estirpes do género *G. xylinus*: ATCC 53582 e ATCC 700178. Um dos meios tinha melaço como fonte de carbono, um subproduto da produção de açúcar. Este resíduo foi utilizado sem sofrer qualquer tipo de pré-tratamento mostrando uma produção de celulose bacteriana baixa, para as duas estirpes, quando comparada com o outro meio, HS, que continha glucose pura como fonte de carbono. Esta baixa produção deve-se à presença de compostos indesejáveis no melaço; alternativamente pelo facto das estirpes estudadas não terem preferência pelo consumo de sacarose como fonte de carbono (característico do melaço). Esta conclusão é parcial no entanto, na medida em que além da fonte de carbono, outros constituintes do meio de cultura, entre o melaço e o HS, variaram. No entanto, o rendimento obtido com este resíduo foi superior ao obtido para o meio HS mostrando que, industrialmente, a sua utilização pode ser mais favorável, para se obter um menor custo de produção. Foi ainda possível concluir, através da quantificação de açúcares, no meio de melaço, que a estirpe ATCC 700178 tem um maior consumo de açúcares uma vez que este foi superior para esta estirpe em apenas 4 dias de fermentação, comparativamente ao consumo obtido pela estirpe ATCC 53583 em 6 dias. Isto pode indicar uma taxa de crescimento superior.

Para além do estudo de diferentes meios de cultivo, foi estudada a adição de um polímero, CMC, no meio de cultura e em diferentes concentrações para analisar as modificações que este provoca nas membranas de celulose bacteriana. Através da análise do grau de *swelling* e dos ângulos de contato calculados para as diferentes membranas obtidas após modificação *in situ*, é possível concluir que a CMC não tem influência na estrutura das membranas, uma vez que não existem diferenças entre os resultados obtidos. No entanto, o grau de *swelling*, permitiu concluir que o meio de melaço provoca um aumento nos poros das membranas, aumentando a sua capacidade de retenção de água. O mesmo se pode concluir das medições dos ângulos de contato, onde se observa que estes são menores para as membranas produzidas no meio de melaço, indicando maior hidrofiliçidade.

Em relação à modificação *ex situ*, foi estudada a adsorção de CMC, em diferentes concentrações, na superfície das fibras de CB, com diferentes tempos de contato e diferentes temperaturas de exposição. Em relação à variação da temperatura, é possível verificar que esta não teve uma influência linear para as diferentes amostras. É possível concluir, pelos resultados obtidos nesta modificação, que o melhor meio para adsorção de CMC *ex situ* é o meio de melaço pois os resultados mostraram membranas mais hidrofílicas neste meio.

4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

A caracterização por FTIR permitiu verificar a composição química das amostras modificadas, verificando-se a ausência de CMC nas membranas de CB. Estes resultados foram visíveis para os dois métodos de modificação.

Existem aspetos que foram notados ao longo da execução do trabalho que devem ser analisados mas que, devido a limitações de tempo, não foram possíveis de concretizar durante este projeto. Assim, ficam aqui sugeridos para trabalhos futuros. O estudo de processos de pré-tratamento do melaço de forma a retirar os compostos indesejáveis deve ser feito de forma detalhada, de forma a não aumentar excessivamente o custo de produção de CB.

Estudos como avaliar o pH ao longo da fermentação no meio HS ou quantificar os ácidos presentes neste, no final da fermentação, ajudam a completar a experiência efetuada neste projeto. Poderá ser interessante estudar diferentes fontes de carbono e azoto, conjugadas, de forma a perceber qual será a melhor combinação para a produção de CB pela bactéria *G. xylinus*.

Em relação à modificação *ex situ*, deveriam ser feitos estudos mais alargados relativamente ao tempo de contato das membranas com as soluções de CMC, de forma a estudar o tempo necessário até à estabilização da adsorção, ou seja, o tempo que demora até que a membrana não é capaz de adsorver mais CMC. O facto das membranas produzidas não serem homogéneas também afetou a adsorção do polímero. Assim, uma forma de ultrapassar este problema, é a produção de membranas de celulose maiores, nas quais seja possível obter amostras mais homogéneas entre si. Além disso, a modificação poderá ser feita em membranas de maiores dimensões e, só depois, são obtidas amostras para caracterização, diminuindo a probabilidade de a adsorção do CMC não ter ocorrido de igual forma.

Para além disto, trabalhos futuros devem-se focar na utilização destas membranas modificadas para utilização nas diferentes indústrias, por exemplo, através de estudos de ligação de proteínas com capacidade antimicrobiana.

5. Bibliografia

- [1] P. Ross, R. Mayer, and M. Benziman, "Cellulose biosynthesis and function in bacteria," *Microbiological reviews*, vol. 55, no. 1, pp. 35-58, Mar. 1991.
- [2] S. S. M. S. Keshk, T. M. T. Razek, and K. Sameshima, "Bacterial cellulose production from beet molasses," *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 17, pp. 1519-1523, 2006.
- [3] T. R. S. Silva, "Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para a cultura de células e permeação de biomoléculas," Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- [4] P. M. da C. Carreira, "Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais," Universidade de Aveiro, 2010.
- [5] V. T. Nguyen, B. Flanagan, M. J. Gidley, and G. a Dykes, "Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha," *Current microbiology*, vol. 57, pp. 449-53, Nov. 2008.
- [6] S. M. A. . Keshk and K. Sameshima, "Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production," *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 6, pp. 478-482, 2005.
- [7] F. K. Andrade, R. A. N. Pertile, F. Dourado, and F. M. Gama, "Bacterial Cellulose: Properties, production and applications," in *Cellulose: Structure and Properties, Derivatives and Industrial Uses*, T. Lejeune, A Deprez, Ed. Braga: Nova Science Publishers, 2010, pp. 427-458.
- [8] E. Al-Shamary and A. Al-Darwash, "Influence of Fermentation Condition and Alkali Treatment on the Porosity and Thickness of Bacterial Cellulose Membranes," *The Online Journal of Science and Technology*, vol. 3, no. 2, pp. 194-203, 2013.
- [9] R. A. N. Pértile, "Bacterial cellulose: studies on biocompatibility, surface modification and interaction with cells," Universidade do Minho, 2010.
- [10] L. Zemljič, P. Stenius, J. Laine, K. Stana-Kleinschek, and L. Fras Zemljič, "Topochemical modification of cotton fibres with carboxymethyl cellulose," *Cellulose*, vol. 15, no. 2, pp. 315-321, Sep. 2008.
- [11] S. O. Bae and M. Shoda, "Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 67, no. 1, pp. 45-51, Apr. 2005.
- [12] H.-H. Chen, L.-C. Chen, H.-C. Huang, and S.-B. Lin, "In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus*," *Cellulose*, vol. 18, pp. 1573-1583, Sep. 2011.

5. Bibliografia

- [13] V. L. Calil, "Desenvolvimento de substratos poliméricos avançados para aplicação em dispositivos orgânicos flexíveis," Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2010.
- [14] H. El-Saied, A. I. A. El-Diwany, D. Basta, AH Atwa, NA El-Ghwas, A. H. Basta, N. A. Atwa, and D. E. El-Ghwas, "Production and characterization of economical bacterial cellulose," *bioresources*, vol. 3, no. 4, pp. 1196-1217, 2008.
- [15] R. M. Brown Jr, "Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century?," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 42, pp. 487-495, 2004.
- [16] R. Vieira, "Estudo da eficiência e durabilidade de diversos métodos de fixação de produtos antimicrobianos em fibras celulósicas," Universidade do Minho, 2006.
- [17] D. J. Gardner, G. S. Oporto, R. Mills, and M. A. S. A. Samir, "Adhesion and Surface Issues in Cellulose and Nanocellulose," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 22, pp. 545-567, Jan. 2008.
- [18] J. R. C. Pinto, "Estudo das Propriedades de Superfície da Celulose por Cromatografia Gasosa Inversa : Interação Celulose – CBD," Universidade do Minho, 2002.
- [19] J. R. C. Pinto, "Production of Cellulose-Binding Domains by Proteolysis; Studies on the Adsorption and Modification of Cellulose Fibres," Universidade do Minho, 2006.
- [20] J. Shokri and K. Adibkia, "Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries," in *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*, 2013, pp. 47-66.
- [21] G. Scionti, "Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Implants," Chalmers university of technology, 2010.
- [22] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, and W. Wagenknecht, "Introduction," in *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods, Volume 1*, vol. I, 2004, pp. 1-7.
- [23] Z. Cai and J. Kim, "Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility," *Cellulose*, vol. 17, pp. 83-91, Sep. 2009.
- [24] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown, "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1-12, Jan. 2007.

- [25] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, and S. Marsch, "Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery," *Progress in Polymer Science*, vol. 26, pp. 1561-1603, 2001.
- [26] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, and A. Bohn, "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material," *Angewandte Chemie*, vol. 44, pp. 3358-93, May 2005.
- [27] F. Lina, Z. Yue, Z. Jin, and Y. Guang, "Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials," in *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, 2011, pp. 249-274.
- [28] Y. Yamada, K. Hoshino, and T. Ishikawa, "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 61, no. 8, pp. 1244-1251, 1997.
- [29] D. de O. S. Recouvreux, "Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos," Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- [30] M. S. Dayal, N. Goswami, A. Sahai, V. Jain, G. Mathur, and A. Mathur, "Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter aceti* MTCC 2623," *Carbohydrate polymers*, vol. 94, pp. 12-16, Apr. 2013.
- [31] K.-C. Cheng, J. M. Catchmark, and A. Demirci, "Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis," *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 730-736, 2011.
- [32] R. Jonas and L. F. Farah, "Production and application of microbial cellulose," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 101-106, 1998.
- [33] S. Bielecki, A. Krystynowicz, M. Turkiewicz, and H. Kalinowska, "Bacterial Cellulose," *Biopolymers Online*, pp. 37-46, 2005.
- [34] K. Ramana, A. Tomar, and L. Singh, "Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, pp. 245-248, 2000.
- [35] K.-C. Cheng, J. M. Catchmark, and A. Demirci, "Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis," *Journal of biological engineering*, vol. 3, no. 12, pp. 1-10, Jan. 2009.
- [36] L. M. F. Gottschalk et al., "Produção de celulose bacteriana pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 com diferentes fontes de nitrogênio," in *VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio*, 2013.

5. Bibliografia

- [37] A. S. C. Nunes, "Bacterial Cellulose as a Nanostructured Functional Material for Biomedical Applications," Universidade do Minho, 2012.
- [38] P. R. Chawla, I. B. Bajaj, S. A. Survase, and R. S. Sinngal, "Microbial cellulose: Fermentative production and applications," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 47, no. 2, pp. 107-124, 2009.
- [39] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R. M. Brown, "Microbial cellulose-the natural power to heal wounds," *Biomaterials*, vol. 27, no. 2, pp. 145-51, Jan. 2006.
- [40] J. Shah and R. M. Brown, "Towards electronic paper displays made from microbial cellulose," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 66, pp. 352-5, Jan. 2005.
- [41] Y. Hu, "A novel bioabsorbable bacterial cellulose," Pennsylvania State University, 2011.
- [42] E. E. Brown, "Bacterial cellulose/thermoplastic polymer nanocomposites," Washington State University, 2007.
- [43] B. A. McKenna, D. Mikkelsen, J. B. Wehr, M. J. Gidley, and N. W. Menzies, "Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524," *Cellulose*, vol. 16, no. 6, pp. 1047-1055, Jul. 2009.
- [44] M. Iguchi, S. Yamanaka, and A. Budhiono, "Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts," *Journal of Materials Science*, vol. 35, pp. 261-270, 2000.
- [45] A. Budhiono, B. Rosidi, H. Taher, and M. Iguchi, "Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system," *Carbohydrate Polymers*, vol. 40, pp. 137-143, Oct. 1999.
- [46] B. Surma-Ślusarska, S. Presler, and D. Danielewicz, "Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from *Acetobacter Xylinum* Culture for Application in Papermaking," *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, vol. 16, no. 4, pp. 108-111, 2008.
- [47] W. Gao, K. Chen, R. Yang, F. Yang, and W. Han, "Properties of bacterial cellulose and its influence on the physical properties of paper," *BioResources*, vol. 6, pp. 144-153, 2011.
- [48] J. George, K. V. Ramana, S. N. Sabapathy, and a. S. Bawa, "Physico-Mechanical Properties of Chemically Treated Bacterial (*Acetobacter xylinum*) Cellulose Membrane," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, no. 8–9, pp. 1323-1327, Dec. 2005.

- [49] D. Barzyk, D. Page, and A. Ragauskas, "Acidic group topochemistry and fiber-to-fiber specific bond strength," *Journal of pulp and paper science*, 1996.
- [50] W. Tongdeesoontorn, L. J. Mauer, S. Wongruong, P. Sriburi, and P. Rachtanapun, "Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films," *Chemistry Central journal*, vol. 5, no. 1, p. 6, Jan. 2011.
- [51] J. Laine, "Studies on topochemical modification of cellulosic fibres-Part 4. Toposelectivity of carboxymethylation and its effects on the swelling of fibres," *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, vol. 18, pp. 316-324, 2003.
- [52] M. Ankerfors, E. Duker, and T. Lindström, "Topo-chemical modification of fibres by grafting of carboxymethyl cellulose in pilot scale," *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, vol. 28, no. 1, pp. 6-14, 2013.
- [53] S. Chen et al., "Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal," *Journal of hazardous materials*, vol. 161, pp. 1355-1359, Jan. 2009.
- [54] M. Alves, "A Aplicabilidade do Polímero Carboximetilcelulose (CMC)," Faculdade de Tecnologia da Zona Leste, São Paulo, 2009.
- [55] H. Heydarzadeh, G. Najafpour, and A. Nazari-Moghaddam, "Catalyst-free conversion of alkali cellulose to fine carboxymethyl cellulose at mild conditions," *World Applied Sciences Journal*, vol. 6, no. 4, pp. 564-569, 2009.
- [56] B. M. Cerrutti, "Biomacromoléculas carboximetiladas: atuação como agentes de estabilização de suspensões aquosas em alumina," Universidade de São Paulo, 2010.
- [57] K. Kamide, K. Okajima, K. Kowsaka, T. Matsui, S. Nomura, and K. Hikichi, "Effect of the Distribution of Substitution of the Sodium Salt of Carboxymethylcellulose on Its Absorbency toward Aqueous Liquid," *Polymer Journal*, vol. 17, no. 8, pp. 909-918, 1985.
- [58] H. Almlöf, "Extended Mercerization Prior to Carboxymethyl Cellulose Preparation," Karlstad University Studies, Karlstad, 2010.
- [59] K. M. Hong, "Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose from sugarcane bagasse," Universiti Tunku Abdul Rahman, 2013.
- [60] H. A. Ambjörnsson, K. Schenzel, and U. Germgård, "Carboxymethyl Cellulose Produced at Different Mercerization Conditions and Characterized by NIR FT Raman Spectroscopy in Combination with Multivariate Analytical Methods," *BioResources*, vol. 8, no. 2, pp. 1918-1932, 2013.

5. Bibliografia

- [61] X. He, S. Wu, D. Fu, and J. Ni, "Preparation of sodium carboxymethyl cellulose from paper sludge," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 84, pp. 427-434, Mar. 2009.
- [62] M. P. Adinugraha and D. W. Marseno, "Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (Musa cavendishii LAMBERT)," *Carbohydrate Polymers*, vol. 62, pp. 164-169, Nov. 2005.
- [63] T. Heinze and A. Koschella, "Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review," *Macromolecular Symposia*, vol. 223, pp. 13-39, Mar. 2005.
- [64] C. M. F. Martinez, "Obtenção e caracterização de materiais absorventes através da carboximetilação de polpa etanol/água de medula de bagaço de cana-de-açúcar," Universidade de São Paulo, 1996.
- [65] A. Bono, P. Ying, F. Yan, C. Muei, R. Sarbatly, and D. Krishnaiah, "Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from palm kernel cake," *Advances in Natural and Applied Sciences*, vol. 3, pp. 5-11, 2009.
- [66] H. Nie, M. Liu, F. Zhan, and M. Guo, "Factors on the preparation of carboxymethylcellulose hydrogel and its degradation behavior in soil," *Carbohydrate Polymers*, vol. 58, pp. 185-189, Nov. 2004.
- [67] M. T. Ghannam and M. N. Esmail, "Rheological properties of carboxymethyl cellulose," *Journal of applied polymer science*, vol. 64, pp. 289-301, 1997.
- [68] B. Rivas, A. B. Moldes, J. M. Domínguez, and J. C. Parajó, "Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*," *International journal of food microbiology*, vol. 97, no. 1, pp. 93-8, Dec. 2004.
- [69] F. Hong and K. Qiu, "An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770," *Carbohydrate Polymers*, vol. 72, no. 3, pp. 545-549, May 2008.
- [70] T. Oikawa, T. Ohtori, and M. Ameyama, "Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 331-332, 1995.
- [71] S. Kamarudin, K. M. Sahaid, T. M. Sobri, W. Y. W. Mohtar, A. B. D. Radiah, and H. Norhasliza, "Different Media Formulation on Biocellulose Production by *Acetobacter xylinum* (0416)," *Pertanika Journal of Science and TEchnology*, vol. 21, no. 1, pp. 29-36, 2013.
- [72] Y. Chao, Y. Sugano, and M. Shoda, "Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift

- reactor," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 55, no. 6, pp. 673-679, Jun. 2001.
- [73] H.-J. Son, H.-G. Kim, K.-K. Kim, H.-S. Kim, Y.-G. Kim, and S.-J. Lee, "Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions," *Bioresource technology*, vol. 86, no. 3, pp. 215-9, Feb. 2003.
- [74] H.-I. Jung et al., "Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 162, no. 2, pp. 486-97, Sep. 2010.
- [75] S. Kongruang, "Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 148, pp. 245-256, 2008.
- [76] D. Mikkelsen, B. Flanagan, G. Dykes, and M. Gidley, "Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524," *Journal of applied microbiology*, vol. 107, pp. 576-583, Aug. 2009.
- [77] A. Kurosumi, C. Sasaki, Y. Yamashita, and Y. Nakamura, "Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693," *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, no. 2, pp. 333-335, Mar. 2009.
- [78] D. N. Thompson and M. a Hamilton, "Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 91-93, no. 12, pp. 503-13, Jan. 2001.
- [79] B. P. Calabia and Y. Tokiwa, "Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*," *Biotechnology letters*, vol. 29, no. 9, pp. 1329-32, Sep. 2007.
- [80] C. Kotzamanidis, T. Roukas, and G. Skaracis, "Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130," *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 18, pp. 441-448, 2002.
- [81] S. Kalogiannis, G. Iakovidou, M. Liakopoulou-Kyriakides, D. a Kyriakidis, and G. N. Skaracis, "Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses," *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 2, pp. 249-256, Oct. 2003.
- [82] T. Roukas, "Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture," *Journal of Food Engineering*, vol. 27, pp. 87-96, 1996.

5. Bibliografia

- [83] A. Sheoran, B. Yadav, P. Nigam, and D. Singh, "Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1," *Journal of basic microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 123-128, Jan. 1998.
- [84] M. Pazouki, P. A. Felse, J. Sinha, and T. Panda, "Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose," *Bioprocess Engineering*, vol. 22, no. 4, pp. 0353-0361, Apr. 2000.
- [85] D. K. Y. Solaiman, R. D. Ashby, J. a Zerkowski, and T. a Foglia, "Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*," *Biotechnology letters*, vol. 29, no. 9, pp. 1341-7, Sep. 2007.
- [86] S. Premjet, D. Premjet, and Y. Ohtani, "The Effect of Ingredients of Sugar Cane Molasses on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245," *Fiber*, vol. 63, pp. 193-199, 2007.
- [87] N. Noro, Y. Sugano, and M. Shoda, "Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 64, pp. 199-205, Apr. 2004.
- [88] R. P. Kona, N. Qureshi, and J. S. Pai, "Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor," *Bioresource technology*, vol. 78, no. 2, pp. 123-6, Jun. 2001.
- [89] S. M. Santos, J. M. Carbajo, and J. C. Villar, "The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration," *BioResources*, vol. 8, no. 3, pp. 3630-3645, 2013.
- [90] S. Hestrin and M. Schramm, "Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose," *Biochemical Journal*, vol. 58, pp. 345-352, 1954.
- [91] T. G. Chiciudean, A. Stoica, T. Dobre, and M. van Tooren, "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY (VINYL ALCOHOL)-BACTERIAL CELLULOSE NANOCOMPOSITE," *UPB Sci. Bull.*, vol. 73, no. 2, pp. 17-30, 2011.
- [92] F. V. Berti, "Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em Scaffolds de celulose bacteriana," Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- [93] D. Norouzian et al., "Study of nano-fiber cellulose production by *Glucanacetobacter xylinum* ATCC 10245," *Pakistan journal of Biological Sciences*, vol. 14, no. 15, pp. 780-784, 2011.
- [94] A. Leyva, A. Quintana, M. Sánchez, E. N. Rodríguez, J. Cremata, and J. C. Sánchez, "Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to

- quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation," *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, vol. 36, pp. 134-41, Mar. 2008.
- [95] R. do N. SILVA, V. N. MONTEIRO, J. D. X. ALCANFOR, E. M. ASSIS, and E. R. ASQUIERI, "Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel," *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 23, no. 3, pp. 337-341, 2003.
- [96] A. de S. Moser, "Efeito da micro-oxigenação na qualidade química e sensorial da cachaça não envelhecida," Universidade Federal do Paraná, 2012.
- [97] A. Laurentin and C. A. Edwards, "A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates," *Analytical Biochemistry*, vol. 315, no. 1, pp. 143-145, Apr. 2003.
- [98] M. Ul-Islam, T. Khan, and J. K. Park, "Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification," *Carbohydrate Polymers*, vol. 88, no. 2, pp. 596-603, Apr. 2012.
- [99] F. A. Aouada, E. C. Muniz, C. M. Vaz, and L. H. Mattoso, "Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poli(acrilamida) e metilcelulose," *Química Nova*, vol. 32, no. 6, pp. 1482-1490, 2009.
- [100] C. R. Rosina, S. Baroni, and O. A. Cavalcanti, "Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*)," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 40, no. 3, pp. 425-431, 2004.
- [101] Y. Bao, J. Ma, and N. Li, "Synthesis and swelling behaviors of sodium carboxymethyl cellulose-g-poly(AA-co-AM-co-AMPS)/MMT superabsorbent hydrogel," *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, no. 1, pp. 76-82, Feb. 2011.
- [102] V. S. G. Gustavo and O. A. Cavalcanti, "Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 39, no. 4, pp. 441-448, 2003.
- [103] E. Poyrazo and H. Biyik, "Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 9, pp. 1037-1045, May 2011.
- [104] M. Schramm, Z. Gromet, and S. Hestrin, "Role of hexose phosphate in synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*," *Nature*, vol. 179, no. 5, pp. 28-29, 1957.

5. Bibliografia

- [105] A. Seto, Y. Kojima, and N. TONOUCI, "Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for sucrose as a carbon source," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 61, no. 4, pp. 735-736, 1997.
- [106] J. D. Fontana et al., "Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute.," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 24-25. pp. 253-64.
- [107] E. Galas, A. Krystybiwicz, L. Tarabasz-Szymanska, T. Pankiewicz, and M. Rzyska, "Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis," *Acta Biotechnologica*, vol. 19, no. 3, pp. 251-260, 1999.
- [108] S. Masaoka, T. Ohe, and N. Sakota, "Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*," *Journal of fermentation and bioengineering*, vol. 75, no. 1, pp. 18-22, 1993.
- [109] S. Bae and M. Shoda, "Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium," *Biotechnology progress*, vol. 20, no. 5, pp. 1366-1371, 2004.
- [110] T. Roukas, "Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production," *Process Biochemistry*, vol. 33, no. 8, pp. 805-810, Nov. 1998.
- [111] E. Toksoy, "Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass," in *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, Z. Fang, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [112] N. Yodsuwan, A. Owatworakit, A. Ngaokla, N. Tawichai, and N. Soykeabkaew, "Effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production for bionanocomposite materials," *1st Mae Fah Luang University International Conference*. Chiang Rai, 2012.
- [113] W. Dudman, "Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium," *Journal of general microbiology*, vol. 21, pp. 327-337, 1959.
- [114] K.-C. Cheng, J. M. Catchmark, and A. Demirci, "Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property," *Cellulose*, vol. 16, pp. 1033-1045, Aug. 2009.
- [115] D. R. Ruka, G. P. Simon, and K. M. Dean, "In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate," *Carbohydrate polymers*, vol. 92, no. 2, pp. 1717-1723, Feb. 2013.
- [116] P. Wanichapichart, S. Kaewnopparat, K. Buaking, and W. Puthai, "Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*," *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 24, pp. 855-862, 2002.

- [117] W. Borzani and S. Souza, "Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media," *Biotechnology letters*, vol. 17, no. 11, pp. 1271-1272, 1995.
- [118] W. Borzani and S. D. Souza, "A simple method to control the bacterial production of cellulosic films in order to obtain dried pellicles presenting a desired average thickness," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 14, pp. 59-61, 1998.
- [119] P. J. Flory and J. Rehner, "Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 11, no. 11, pp. 521-526, 1943.
- [120] M. Blomstedt, *Modification of cellulosic fibers by carboxymethyl cellulose: effects on fiber and sheet properties*. Helsinki: , 2007.
- [121] S. Keshk and K. Sameshima, "The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of liginosulfonate for the production of bacterial cellulose," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 72, no. 2, pp. 291-6, Oct. 2006.
- [122] T. R. . Sil, "Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas," Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- [123] A. Sturcová, I. His, D. C. Apperley, J. Sugiyama, and M. C. Jarvis, "Structural details of crystalline cellulose from higher plants.," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 1333-9, 2004.
- [124] J.-F. Su, Z. Huang, X.-Y. Yuan, X.-Y. Wang, and M. Li, "Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions," *Carbohydrate Polymers*, vol. 79, no. 1, pp. 145-153, Jan. 2010.
- [125] S. Y. Oh et al., "Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy," *Carbohydrate research*, vol. 340, no. 15, pp. 2376-91, Oct. 2005.
- [126] M. N. Chai, "The Oleic Acid Composition Effect on the Carboxymethyl Cellulose Based Biopolymer Electrolyte," *Journal of Crystallization Process and Technology*, vol. 03, no. 01, pp. 1-4, 2013.
- [127] M. Mohkami and M. Talaeipour, "Investigation of the chemical structure of carboxylated and carboxymethylated fibers from waste paper via XRD and FTIR analysis," *BioResources*, vol. 6, no. 2, pp. 1988-2003, 2011.

5. Bibliografia

- [128] J. Wang and P. Somasundaran, "Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid-liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques.," *Journal of colloid and interface science*, vol. 291, no. 1, pp. 75-83, Nov. 2005.
- [129] F. Carrillo, X. Colom, J. . Suñol, and J. Saurina, "Structural FTIR analysis and thermal characterisation of lyocell and viscose-type fibres," *European Polymer Journal*, vol. 40, no. 9, pp. 2229-2234, Sep. 2004.